

***Az *Acaryochloris marina* cianobaktérium kettes fotokémiai  
rendszerének D1, D2 és citokróm b559 alegységeit, valamint a  
Hox hidrogenázt kódoló gének kifejeződésének vizsgálata***

Ph.D. értekezés

Kiss Éva

Témavezető: Dr. Vass Imre

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológia Intézet

SZTE TTIK

Szeged

2012

Rövidítések jegyzéke .....	5
1. Bevezetés .....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. Cianobaktériumok.....	9
2.2. A fotoszintézis folyamata .....	10
2.2.1. Fotoszintetikus fénybegyűjtési módok .....	12
2.2.2. A fotoszintetikus membránban zajló elektrontranszport folyamatok.....	13
2.3. A PSII központi heterodimer és a citokróm b559.....	16
2.3.1. A cianobakteriális <i>psbA</i> géncsaládok, és D1 izoformák .....	18
2.3.2. A cianobakteriális <i>psbD</i> gének .....	22
2.3.3. A cit b559 alegységei és az azokat kódoló gének .....	23
2.4. Oxigénfejlesztő fotoszintézis a látható fénytartományon kívül.....	23
2.4.1. <i>d</i> -klorofill tartalmú cianobaktériumok.....	24
2.4.2. Az <i>A. marina</i> fotoszintézise, reakciócentrum klorofillja .....	27
2.4.3. Az <i>A. marina</i> fénybegyűjtő rendszere .....	28
2.5. Biohidrogén termelés cianobakteriális rendszerekben .....	29
2.5.1. A cianobakteriális hidrogenázok .....	30
2.5.2. Az <i>A. marina</i> Hox hidrogenáza .....	33
3. Célkitűzések.....	34
4. Kísérleti anyagok és módszerek.....	35
4.1. Nevelési és kísérleti körülmények .....	35
4.2. A klorofill fluoreszcencia mérése .....	36
4.3. Relatív mRNS szintek meghatározása kvantitatív RT-PCR módszerrel. ....	36
4.4. A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése.....	39
4.5. <i>In silico</i> fehérje analízis.....	39
5. Eredmények .....	41

5.1. A fotoszintetikus akklimatizáció fiziológiai megnyilvánulásai.....	41
5.1.1. A plasztokinon állomány redukálásának nyomon követése klorofill fluoreszcencia méréssel .....	42
5.1.2. Fotoszintetikus aktivitás látható és távoli vörös fényben és a respiráció mértéke sötétben.....	45
5.1.3. <i>In vivo</i> abszorpciós változások limitált fényviszonyokhoz való alkalmazkodás során.....	48
5.2. Génkifejeződési vizsgálatok .....	49
5.2.1. Az <i>A. marina</i> <i>psbA</i> , <i>psbD</i> és <i>psbE</i> géncsaládjai .....	49
5.2.2. Alacsony fényintenzitáshoz és távoli vörös fényhez való alkalmazkodás...	51
5.2.3. A cit b559 alegységeinek génkifejeződése <i>A. marina</i> -ban .....	53
5.2.4. A <i>psbA</i> és <i>psbD</i> homológok kifejeződését érintő stressz válaszok .....	55
5.2.4.1. A <i>psbD</i> génnek kifejeződése UV-B és magas intenzitású fénystressz hatására .....	55
5.2.4.2. A <i>psbA</i> génnek kifejeződése UV-B, magas intenzitású fénystressz, elektrontranszport gátlás és oxigénhiány hatására .....	57
5.2.5. A szolubilis hidrogenáz transzkripciójának vizsgálata .....	60
5.2.5.1. A <i>hox</i> génnek kifejeződése <i>Synechocystis</i> -ben.....	60
5.2.5.2. Az <i>A. marina</i> <i>hox</i> génjeinek kifejeződése távoli vörös és alacsony intenzitású fényhez való alkalmazkodás során .....	62
5.2.5.3. A <i>hox</i> génnek kifejeződése az <i>A. marina</i> -ban, a <i>Synechocystis</i> -ben és a <i>Synechococcus</i> -ban.....	64
5.2.5.4. A Hox hidrogenáz kis diaforáz alegységének filogenetikai analízise...	66
6. Az eredmények megvitatása .....	68
6.1. A fotoakklimáció fiziológiai megnyilvánulásai.....	69
6.2. Az eltérő fényviszonyokhoz való adaptáció jelei transzkriptom szinten .....	70
6.3. Egyedülálló cit b559 kifejeződés.....	71
6.4. Az <i>A. marina</i> <i>psbA</i> géncsaládja .....	73
6.5. A <i>hox</i> génkifejeződés a <i>Synechocystis</i> -ben és az <i>A. marina</i> -ban.....	76
7. Az eredmények összefoglalása .....	80

8. A dolgozatban felhasznált közlemények.....	82
9. Irodalomjegyzék .....	83
Összefoglalás .....	96
Summary .....	101
Köszönetnyilvánítás .....	106

## Rövidítések jegyzéke

AF – alacsony fény

AP - allofikocianin (allophycocyanin)

Chl – klorofill (chlorofill)

Cid - citokróm bd oxidáz / kinol oxidáz

Cit – citokróm

CP43 - 43 kilodaltonos klorofill-kötő fehérje, PsbC

CP47 - 47 kilodaltonos klorofill-kötő fehérje, PsbB

ctaI - citokróm c oxidáz / respirációs terminális oxidáz

DBMIB - dibromotimokinon

DCMU - 3-(3,4-Diklorofenil)-1, 1-dimetilurea

Fd - ferredoxin

FMN – Flavin mononukleotid

FNR – ferredoxin -  $\text{NADP}^+$  reduktáz

GED - Gene Expression's  $C_T$  Difference

LHC – fénybegyűjtő komplex (Light Harvesting Complex)

MF – magas fény

$\text{NAD(P)}^+$  - nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NDH-1 - egyes-típusú NADH dehidrogenáz / egyes-típusú respirációs komplex

NDH-2 - kettes-típusú NADH dehidrogenáz

NF – nevelési fény

OEC – vízbontó komplex (Oxygen Evolving Centre)

PBP – fikobiliprotein (phycobiliprotein)

PBS – fikobiliszóma (phycobilisome)

PC - fikocianin (phycocyanin)

PE - fikoeritrin (phycoerithrin)

P<sub>D1</sub>, P<sub>D2</sub> – a D1 és D2 fehérjén kötött központi klorofill pár (pair of chlorophylls)

Pheo – feofitin (pheofitin)

PQ pool - plasztokinon molekulák állománya

PSI – egyes fotokémiai rendszer (Photosystem I)

PSII – kettes fotokémiai rendszer (Photosystem II)

Q<sub>A</sub> – elsődleges kinon akceptor

Q<sub>B</sub> – másodlagos kinon akceptor

RC – reakció centrum

SDH - szukcinát dehidrogenáz

## 1. Bevezetés

A cianobakteriális hidrogenázok jelentősége napjainkban előtérbe helyeződött az alternatív energiaforrások kutatása kapcsán. Az egyik biotechnológiai elgondolás szerint fényenergia felhasználásával a fotoszintézis útján állítanánk elő a hidrogénfejlesztéshez szükséges elektronokat és protonokat. Ahhoz azonban, hogy megvalósíthassuk a fényből nyert energia hidrogénben történő átmeneti tárolását, a fotoszintézis és a hidrogénfejlesztés folyamatáról rendelkezésünkre álló ismereteink bővítése elengedhetetlen. Különös fontossággal bír a fejlesztésben használt két kulcsenzim: a vízbontásért felelős kettes fotokémiai rendszer (PSII) és a hidrogenáz enzim működésének tanulmányozása. A jelen dolgozat PSII reakciócentrumát (RC) valamint a Hox hidrogenázt kódoló gének kifejeződését vizsgálja *Acaryochloris marina* (továbbiakban: *A. marina*), tengeri cianobaktérium fajban.

A cianobaktériumok rendkívül adaptív élőlények (1); képesek extrém környezeti feltételekhez, szélsőségesen különböző pH-, só koncentráció-, hőmérsékleti- (2,3) vagy fényviszonyokhoz (4) alkalmazkodni. Fotoautotróf életvitelükből adódóan a fotoszintézisnek, mint e baktériumok energiaforrásának a változó környezethez történő hangolása alapvető fontosságú ezen organizmusok adaptációs folyamataiban. Számos PSII-t érintő fotoakklimációt ismerünk (5-7). Ezek közé tartozik a PSII központi heterodimert kódoló több *psbA* illetve *psbD* homológ kifejeződése (8,9).

Az *A. marina* egy olyan cianobaktérium, amely egyedülálló kromatikus adaptációjának köszönhetően *d*-klorofill (Chl) használatával távoli vörös fény hasznosítására specializálódott (10). Elsősorban pigment összetételének dinamikus változtatásával a különböző hullámhosszakhoz, illetve fényintenzitásokhoz való alkalmazkodás területén az *A. marina* talán a legadaptívabb cianobaktérium fajnak tekinthető (11,12). A cianobaktériumok között kiemelkedően nagyméretű genomja és génkészlete (8.36 Mb, 8462 gén), valamint számos újkeletű génduplikátuma arra utal hogy ez az organizmus egy evolúciós átalakulás igen aktív szakaszában van (13-15).

A 2008-ban elérhetővé vált genomszekvenciából (14) ismertté vált, hogy az *A. marina* három *psbA*, és három *psbD* génnel rendelkezik, melyek kettő-kettő különböző D1, illetve D2 izoformát kódolnak. Ezen kívül a PSII centrumának citokróm (cit) b559 alegységeit kódoló gének két külön klaszterbe rendeződnek, és az  $\alpha$  alegység génje, a *psbE*

duplikátuma is jelen van a genomban. Az *A. marina* a jelenleg ismert egyetlen olyan fotoszintetikus organizmus, amely genomjában kettő *psbE*, valamint kettő külön D2 izoformát kódoló három *psbD* homológ is megtalálható (13). A prokarióta genomokban általában csak olyan génduplikátumok maradhatnak fenn, amelyek az adott szelekciós nyomás alatt az egyedek fennmaradása szempontjából előnyt jelentenek (16,17). Ezért az *A. marina* egyedi génduplikátumainak megjelenése valószínűleg előnyt jelentett az egyed számára, így azok fennmaradhattak a genomban, és kifejeződésük feltételezhetően valamilyen módon segíti az *A. marina* fotoszintetikus adaptációját. A dolgozatban az *A. marina* adaptációs képességét, illetve a *psbA*, *psbD* és *psbE* homológok kifejeződését továbbá azok feltételezett szerepét vizsgálatuk.



## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Cianobaktériumok

A cianobaktériumok olyan prokarióta szervezetek, melyek szénforrásként széndioxidot hasznosítva oxigénfejlesztő fotoszintézist folytatnak. A ma élő növények és fotoszintetikus algák őseinek tekinthetők, mintegy 2,7 milliárd éve jelentek meg a Földön (18). A cianobaktériumok voltak az első oxigénfejlesztő fotoszintézist folytató élőlények. Megjelenésüknek köszönhető, hogy a légkörben az oxigén felhalmozódott, és UV sugárzás hatására ózonná alakulva megteremtette bolygónk védőpajzsát, amely az UV sugárzást kiszűrve lehetővé tette a bioszféra kialakulását. A légkörben felszaporodott oxigén továbbá utat adott az aerob respiráció evolúciójának. A szénhidrátok  $O_2$ -alapú elégetése az anaerob fermentációnál jóval hatékonyabb, ezért az aerob respiráció megjelenése a többsejtű szervezetek kifejlődésének előfeltétele lehetett. A cianobaktériumok körében jelent meg először a légköri nitrogén megkötésének képessége is, így bolygónk mai légkörének kialakításában a szén, az oxigén, és a nitrogén körforgása révén alapvető fontosságú volt ezen oxigénfejlesztő baktériumok megjelenése.

Testszerveződésük általában egysejtű, de számos faj fonalas sejttársulást hozhat létre. A fonalas cianobaktériumok sejtdifferenciálódást is mutatnak, és a vegetatív sejtektől eltérő, úgynevezett heterocisztás sejteket, valamint akinétákat hozhatnak létre. A heterociszták nem tartalmaznak funkcionális, oxigénfejlesztő PSII-t, továbbá a sejtfaluk a vegetatív sejtektől eltérő módon a gázok számára átjárhatatlan, így az oxigénre érzékeny nitrogénfixálás ideális helyszínéül szolgálnak. Az óceánokban élő nagyszámú fitoplankton alkotó cianobaktérium faj nitrogénfixáló képességének köszönhető ezen oligotróf vizek élővilágának kialakulása. Mezőgazdasági alkalmazásuk is nitrogénfixáló képességükön alapszik: a rizs terméshozama nagymértékben megnövelhető nitrogénfixáló cianobaktériumok segítségével.

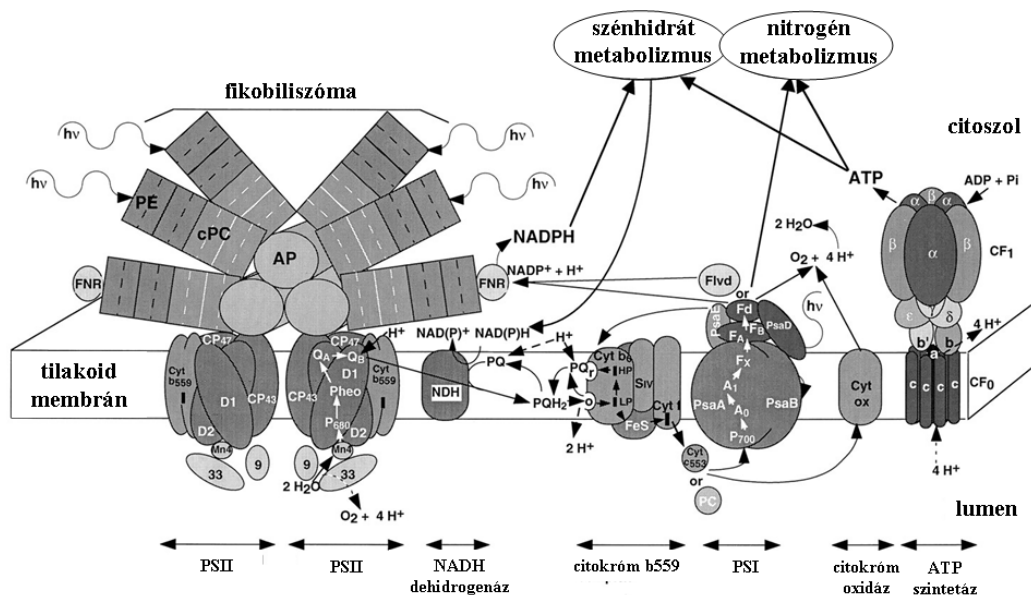
Ősi eredetük, prokarióta sejtszerveződésük, valamint fotoautotróf anyagcseréjük következtében egyedülálló adaptációs képességekkel rendelkeznek. Ennek köszönhetően a Földön széles körben megtalálhatóak, akár extrém környezeti feltételek mellett is (szélsőséges pH, só koncentráció, hőmérsékleti viszonyok, stb.) (1). A genomjuk jelentős része a bakteriális „kromoszómától” elkülönült, attól független sokszorozódásra képes

replikonon található. Ezek a cirkuláris, extrakromoszómális duplaszálú DNS elemek, a plazmidok gyakran hordoznak különböző rezisztenciával vagy stressz válasszal kapcsolatos géneket, amelyek hozzájárulnak a faj adaptációjához. A plazmidokhoz köthető továbbá a laterális gén transzfer jelensége, amely a prokariótákra jellemző nagyfokú genomi plaszticitást segíti elő. A dolgozatban vizsgált *A. marina* genommérete, plazmid- és génkészlete a többi cianobaktérium fajhoz képest jelentősen nagyobb. Ez a jelenség a tengeri faj nagyfokú adaptációs képességét sejteti.

A cianobaktériumok domináns képviselői az óceáni fitoplanktonnak, amely a teljes bioszféra CO<sub>2</sub> fixáló kapacitásának közel feléért felelős. Ebből kifolyólag a cianobakteriális biológiai folyamatok, mint például a fotoszintetikus-akklimáció részletes tanulmányozása különös fontossággal bír bolygónk bioszférájának megismerésében. Ezen kívül a magasabbrendű fotoszintetikus élőlények kloroplasztisaival való rokonságukból eredően fontos modellszervezetként szolgálnak a fotoszintézis kutatásban, különös tekintettel annak evolúciós vonatkozásaira.

## **2.2.A fotoszintézis folyamata**

A fotoszintézis folyamata alapvetően két fő részből, egy fény- és egy sötét szakaszból áll. A fényszakasz helyszíne a fotoszintetikus membrán, a tilakoid, amely sajátos, spirálisan egymásra hajtogatott lapjai elektronmikroszkópos felvételen koncentrikus körökként látszódnak. Az így meghatározott körön „kívül” és „belül” eső területek elnevezése: sztróma, (a cianobaktériumok esetében citoplazma) és lumen. A fényszakasz, azaz a fotofoszforiláció során a fényenergia kémiai energiává alakul. Ezen fényfüggő folyamatban résztvevő membránfehérje-komplexek: a kettes-, és az egyes fotokémiai rendszer (PSII és PSI), a cit b<sub>6</sub>/f, valamint az F-típusú ATP-szintetáz. A folyamatban részt vesznek membránasszociált (cianobaktériumoknál leglényegesebb az úgynevezett fikobiliszóma), és szolubilis komponensek is, úgymint a plasztokinon, plasztocianin/cit c<sub>6</sub>, valamint ferredoxin molekulák. A PSII-től szekvenciálisan működő redox komponenseken keresztül jut el az elektron a fényszakaszból a fotoszintézis sötét szakaszába. Ezt az elektrontranszportot nevezzük lineáris elektrontranszportnak (1.1. ábra).



D. Campbell et al. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62(3):667

### 1.1. ábra: A cianobakteriális fotoszintetikus és respirációs elektrontranszport a tilakoid membránban

A fikobilisómákban található pigment molekulák: AP, PC, PE. A PSII dimer formájában van jelen. A PSII „core”-t a D1/D2 heterodimer, a cit b559 (cytb559), és a CP43, CP47 alkotja. Ehhez kapcsolódik a vízbontó komplex (Mn<sub>4</sub>), melyet a lumen felől a 9 és 33 kiloDaltonos fehérjékből álló reguláló sapka takar. Az elektron útja a PSII komplexen belül: P680, Pheo, Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>. Elsősorban a PSII és az NDH komplex juttatja az elektronokat a plasztokinon (PQ) molekulák állományába. Az elektronok innen jutnak tovább a cit b<sub>6</sub> cyt b<sub>6</sub> alegységére, amely alacsony (LP) vagy magas potenciállal (HP) rendelkezhet. A vas-kén fehérjéről (FeS) a cyt f alegységen keresztül juthat az elektron a szolubilis komponensekre (cyt c553/PC), melyek a cit c terminális oxidáz (Cyt ox), vagy a PSI irányába közvetítenek. PSI-en belüli elektrontranszport: P700, A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, F<sub>x</sub>, F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub>. Az ábrán feltüntetett PSI alegységek: PsaA, PsaB, PsaD, PsaE. Az elektrontranszportban résztvevő vízdékony komponensek: Flvd (flavo-diiron) fehérje, Fd, FNR, PC, cit c553 (cyt c553). Az F-típusú ATP-szintetázt (ATP-ase) két fő funkcionális részből áll: a transzmembrán domén CF<sub>0</sub> és az ehhez kapcsolódó CF<sub>1</sub>-ből, amely három α, három β, és egy-egy ε, δ, γ alegységekből tevődik össze. A fotofoszforilációra épül a sejt nitrogén és szénhidrát metabolizmusa, melyek szoros kapcsolatban állnak egymással és tilakoid membránban zajló elektrontranszporttal (Campbell és munkatársai nyomán (19)).

### 2.2.1. Fotoszintetikus fénybegyűjtési módok

A fotoszintézis első lépése a fényenergia antennákkal történő begyűjtése. A fotoszintetikus antennák sajátos szerkezetű pigment-fehérje komplexek. Ez alól csak egy kivételt ismerünk, a zöld kénbaktériumok kloroszómáit, amelyekben a pigment-pigment szerkezetek dominálnak. Az antennák két fő csoportra: perifériális és integrális antennákra oszthatók. A perifériális antennák membránba ágyazott fehérje komponensekhez kapcsolódnak, de ők maguk nem olvadnak bele a poszfolipid rétegbe. Ilyenek a zöld kénbaktériumok kloroszómái, a páncélos ostorosok peridinin-Chl komplexei, és a cianobaktériumok fikobiliszómái (PBS), melyet az eukariota vörös algákban is megfigyeltek. Az integrális antennák fehérjei a fotoszintetikus membránban ülnek. Ezeknek három fő csoportját különíthetjük el: (i) Fuzionált RC-antenna komplexek, melyekben az antenna és a RC biokémiaiilag nem elválaszthatóak egymástól. Ide tartoznak a zöld kénbaktériumok és heliobaktériumok RC-ai, valamint a PSI. (ii) Központi antennák, amelyek a RC magjához kapcsolódnak, de biokémiaiilag leválaszthatóak. Ilyen az anaerob baktériumok LH1 komplexe, vagy a PSII CP43 és CP47 belső antenna alegységei. (iii) Kísérő antennák, amelyek mindig vagy fuzionált, vagy központi antennák mellett, de soha nem helyett fordulnak elő. Ide tartoznak a bíborbakteriális LH2, valamint a növények *a*- és *b*-Chl tartalmú fénybegyűjtő komplexei (LHC), az LHCII és LHCI (20). A PSII központi részét körbelelő LHCII belső és mobilis (LHCII<sub>m</sub>) antennából áll, az utóbbi mérete fényviszonyoktól függően változhat.

A cianobaktériumok nagy részénél a mobilis, perifériális fénybegyűjtő komplex a PBS fikobiliprotein (PBP) oligomerekből, valamint e fehérjékhez kovalensen kötött fikobilin pigment molekulákból épül fel. A PBS legfőbb szerkezeti alegységei a mag, és az arról sugarasan elágazó rudak, melyek száma leggyakrabban 6. Ezen alegységek felépítésében három féle PBP vehet részt, melyek elrendeződése a PBS szerkezetben szisztematikus. A mag allofikocianint (APC), a rudak pedig fikocianint (PC) és fikoeritrin (PE) tartalmaznak, melyek közül az utóbbi a rudak perifériás részében található (1.1. ábra). A különböző PBP oligomerek eltérő hullámhosszon képesek fényelnyelésre: az APC 652 nm, a PC és PE molekulák pedig 618 nm, illetve 560-575 nm hullámhosszú fényt abszorbeálnak (21). A PBS antennák mérete fényviszonyoktól illetve fajtól függően változhat, vagy akár a teljes antenna hiányozhat (22,23). A perifériális antennákról a gerjesztési energia a belső pigment-fehérje komplexekre jut. A cianobaktériumok tilakoid

membránba ágyazott belső antennái egy 6 transzmembrán helix-domén fehérjecsálád tagjai (24). Ebbe a fehérjecsáládba sorolandó a PSII legfőbb belső Chl-kötő fehérjéje a CP43 és CP47, amelyek minden oxigénfejlesztő fotoszintézist folytató organizmusban megtalálhatóak, valamint a vaséheztetés hatására a PSI körül megjelenő IsiA fehérjékből felépülő *a*-klorofillt kötő szerkezeti egységek (25). A belső antenna transzmembrán fehérjecsálád további tagjaiként azonosították az egyes PBS-t nem tartalmazó tengeri cianobaktériumoknál, a Proklorofitáknál megfigyelt *a*- és *b*-klorofillt kötő, úgynevezett Pcb pigment-fehérje komplexeket (26).

### 2.2.2. A fotoszintetikus membránban zajló elektrontranszport folyamatok

A fotofoszforiláció végső elektrondonora a víz, melynek oxidációja a PSII komplexben zajlik. A PSII felépítésében és funkciójában a központi D1 és D2 fehérjék alkotta heterodimer kulcsfontosságú szerepet tölt be. A perifériás fénybegyűjtő rendszerből a fényenergia a membránba ágyazott központi antennák közvetítésével végül a RC központjában található fotoaktív pigmenteket gerjeszti. A PSII fotoaktív pigmentjei a D1/D2 heterodimeren kötött négy Chl és kettő feofitin (Pheo) molekula ( $P_{D1}$ ,  $P_{D2}$ ,  $Chl_{D1}$ ,  $Chl_{D2}$ ,  $Pheo_{D1}$ ,  $Pheo_{D2}$ ). Az elektrosztatikusan kapcsolt négy fotoaktív Chl gerjesztett állapotban 680 nm-nél jelentkező *in vivo* abszorpció maximummal rendelkezik, ebből kifolyólag szokásos elnevezése a P680. A négy fotoaktív Chl közül kettő szorosabban kapcsolt, ezért ezeket pigment párnak tekinthetjük. A központi pigment pár Chl-jait a D1 és D2 fehérje köti, ebből kifolyólag  $P_{D1}$  illetve  $P_{D2}$ -vel jelöljük. A gerjesztési energia elnyelésekor a központi hat pigmentmolekula alkotta aromás gyűrűk rendszerén töltésszétválások sorozata megy végbe az első néhány ps leforgása alatt (27). A  $P_{D1}$ -től disztálisan elhelyezkedő  $Chl_{D1}$ -ről, mint elsődleges donorról az elektron az elsődleges akceptorra,  $Pheo_{D1}$ -re jut el, és megtörténik az elsődleges töltésszétválás ( $Chl_{D1}^+ Pheo_{D1}^-$ ) (28). Körülbelül 20 ps-al később létrejön a másodlagos töltéspár ( $P_{D1}^+ Pheo_{D1}^-$ ), amely lehetővé teszi az elsődleges fotokémiai reakciót, melynek során a fényenergia kémiai energiává alakul: A  $P_{D1}^+$ -on megjelenő viszonylag stabil pozitív töltés létrehoz egy rendkívül erős oxidálószer (redox potenciálja +1200 mV), amely képes a víztől elektront elvonni, miközben molekuláris oxigén keletkezik és proton ( $H^+$ ) szabadul fel a lumenbe. Egy oxigénmolekula felszabadulásához kettő vízmolekulából négy elektron egymás utáni

leadása szükséges, ezért a folyamathoz a töltések tárolására, stabilizálására van szükség. Ezért a vízbontó komplex (OEC) a felelős, amely a PSII lumen felőli oldalán található, és legalább három hidrofíli polipeptidből (reguláló sapka), valamint négy mangánionból, kettő kloridionból, és egy kalciumionból áll. A kalcium és a négy mangán öt oxigénatommal egy szék alakzatba rendeződik (29) (megtekinthető továbbá az 1.4. ábrán), amelyben a  $\text{Ca}^{2+}$  stabilizáló szerepet tölt be, a  $\text{Cl}^-$  pedig feltételezhetően a Mn ionok redox átmeneteit segíti. A vízbontó komplextől az elektront a D1 protein 161-es tirozinja (TyrZ) veszi át, melyről közvetlen pótlódik a  $\text{P}_{\text{D1}}^+$ -on létrejött elektronhiány ( $\text{TyrZ}^- + \text{P}_{\text{D1}}^+ \rightarrow \text{TyrZ} + \text{P}_{\text{D1}}$ ). Az elsődleges töltésszétválasztás során a  $\text{Pheo}_{\text{D1}}$  molekulára került elektron továbbadódik egy kinon molekulára, a  $\text{Q}_\text{A}$ -ra, amely a D2 polipeptiden stabilan kötött kinon molekula. Az elsődleges kinon akceptor az elektront a D1 polipeptiden lazán kötött másodlagos kinon akceptornak,  $\text{Q}_\text{B}$ -nek adja át néhány száz  $\mu\text{s}$  alatt.

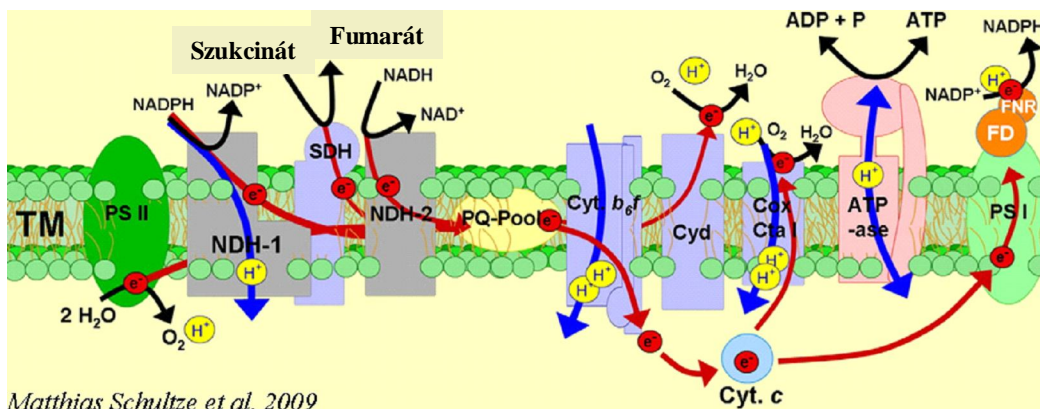
Amikor a D2 fehérjén lazán kötött  $\text{Q}_\text{B}$  megkapja első elektronját a  $\text{Q}_\text{A}^-$ -tól szemikinná alakul, amely erősebb affinitással kötődik a D2 kinon-kötő zsebébe, így addig marad ott, amíg meg nem kapja második elektronját, ekkor protonálódik. A sztrómából (citoplazmából) származó két proton felvétele során kinollá alakulva kötési affinitása lecsökken, és a PSII-ről a tilakoid membrán lipid állományába disszociál, helyére pedig egy oxidált kinon molekula kerül. Ez a kételektronos redox lépés a komplexen belüli elektrontranszportnál már jóval lassabban, milliszekundumos tartományban megy végbe. A PSII belső elektrontranszportján keresztüljutott elektronok tehát a tilakoid membrán lipid rétegében szabadon mozgó hidrofób plasztokinon molekulákra kerülnek. A plasztokinon molekulák redox lépései során újabb protonok kerülnek át a sztrómából a lumenbe, tovább növelve ott a vízbontásból származó protonállományt. Az oldott, redukált plasztokinol molekuláról a protonok lumenbe kerülésekor az elektronok a cit  $\text{b}_6/\text{f}$  membránfehérje komplex vas-kén kockáin keresztül újra szolubilis molekulára, a lumenben található hidrofíli plasztocianinra (vagy a cit  $\text{c}_6$ -ra) kerülnek.

A lineáris elektrontranszport láncban a másik fényindukált töltésszétválasztás a PSI gerjesztett központi Chl-ja ( $\text{P700}^*$ ) és annak elsődleges elektron akceptor Chl-ja, az  $\text{A}_0$  között jön létre ( $\text{P700}^* + \text{A}_0 \rightarrow \text{P700}^+ + \text{A}_0^-$ ). A  $\text{P700}^+$ -on jelentkező elektronhiány a plasztocianin molekulákról pótlódik. A gerjesztett elektron a PSI belső elektrontranszport-komponensein ( $\text{P700} \rightarrow \text{A}_0 \rightarrow \text{A}_1 \rightarrow \text{F}_\text{x} \rightarrow \text{F}_\text{a}/\text{F}_\text{b}$ ) keresztül a szolubilis ferredoxin (Fd) molekulára kerül, ahonnan a ferredoxin/flavodoxin-NADP<sup>+</sup>-reduktáz (FNR) juttatja el a fényszakasz végső elektron akceptorára, a NADP<sup>+</sup>-ra. A fotofoszforiláció során a lumenben protonok halmozódnak fel, kémiai potenciálkülönbséget alakítva ki a tilakoid

membrán két oldala között. A proton gradiens a membránba ágyazott F-típusú ATP-szintetázon keresztül egyenlítődik ki ATP termelése közben. A fényszakaszban keletkezett ATP és  $\text{NADPH}^+$  használódik fel a  $\text{CO}_2$  megkötéséhez és a szénhidrátok asszimilációjához a sötétszakaszban, melyet leírói után Calvin–Benson ciklusnak nevezünk (30)(1.1. ábra).

Egy  $\text{CO}_2$  molekula megkötéséhez 2 NADPH és 3 ATP molekula szükséges. Ezen kívül további ATP igényes folyamatok is lejátszódnak a fotoautotróf sejtekben, mint például az energiaigényes stressz válaszok, kijavító mechanizmusok, keményítő és fehérjék fokozott képződése, vagy például cianobaktériumok esetében a  $\text{CO}_2$  koncentráló mechanizmus vagy a nitrogénfixálás. Ezért a fotoszintetikus sejtek kifejlesztettek egy PSI körüli ciklikus fotofoszforilációt, amely a lineáris elektrontranszporttal ellentétben NADPH-t nem, csak elektrokémiai potenciálkülönbséget, azaz végső soron ATP-t állít elő (1.1. ábra). A ciklikus elektrontranszportnak több útvonalát azonosították, ezek közül a  $\text{PSI} \rightarrow \text{ferredoxin} \rightarrow \text{cit b559} \rightarrow \text{plasztocianin} \rightarrow \text{PSI}$  út bizonyult dominánsnak (31). A környezeti hatások, illetve a sejtek energia igényének függvényében képesek változtatni a lineáris és ciklikus elektrontranszportjuk arányát.

A prokarióta rendszerekre jellemző membrán-kompartmentalizáció hiánya miatt a számos metabolikus út elektrontranszport folyamata egy térben zajlik. A cianobaktériumok esetében számos membránkötött elektrontranszport folyamat osztozik a fotoszintetikus membránon, így a tilakoid nem csak a fotofoszforilációs elektrontranszport lánc, hanem egy jóval komplexebb elektrontranszport hálózat helyszínéül szolgál. A respirációs útvonalak, és azok komponensei, mint például a szukcinát dehidrogenáz (SDH), a terminális oxidázok, kinol oxidázok és az egyes- és a kettes-típusú NADH dehidrogenáz (NDH) is megtalálhatók a tilakoid membránban (1.2. ábra). Az NDH komplexek, valamint a SDH a PSII-höz hasonló módon plasztokinon (PQ) molekulákat redukálnak. A PQ-t közvetlenül oxidálhatják a kinol oxidázok, illetve a PQ-tól a cit  $b_6f$ -en keresztül a cit c-re jutott elektronokért a PSI és a terminális oxidáz verseng (1.2. ábra). A plasztokinon/plasztokinol ( $\text{PQ/PQH}_2$ ) arány kulcsfontosságú szerepet tölt be számos folyamat – elsősorban fotoszintetikus folyamatok – szabályozásában (32-36), ezért a cianobaktériumok esetében a respiráció jelentős mértékben és több szinten (közvetve és közvetlenül) befolyásolja a fotoszintézist (37).



## 1.2. ábra: A plasztokionon molekulák állományát redukáló és oxidáló komplexek a *Synechocystis* PCC 6803 tilakoid membránjában

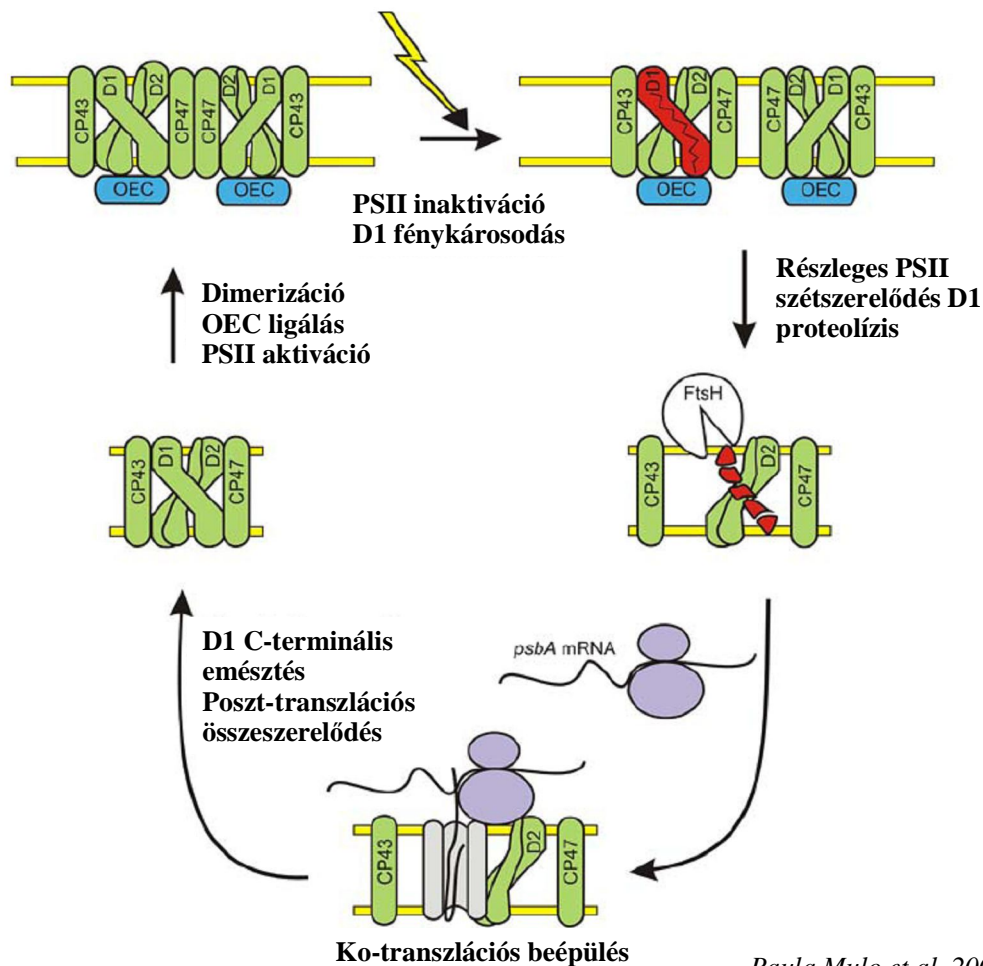
A plasztokionon molekulák állományában (PQ pool) található kinonokat a PSII, az egyes- és kettes-típusú NADH dehidrogenáz (NDH-1, NDH-2) és a szukcinát dehidrogenáz (SDH) redukálja. Az pool-ban található redukált kinol molekulák oxidálását a cit bd oxidáz / kinol oxidáz (Cyd), valamint cit b<sub>6</sub>f (cyt b<sub>6</sub>f) komplexen keresztül, a cit c (Cyt. C) közvetítésével a PSI és a cit c oxidáz / respirációs terminális oxidáz (cox ctaI) végzi. A PSII, az NDH-1, a cyt b<sub>6</sub>f, és a cox ctaI komplexek működésük során H<sup>+</sup>-t juttatnak a lumenbe. A membrán két oldala között létrejött H<sup>+</sup> grádiens kiegyenlítését az ATP-szintetáz (ATP-ase) végzi, melynek működése révén az elektrokémiai potenciál ATP szintézisére fordítódik. Az elektrontranszport utakat piros, a proton transzlokációs lépéseket pedig kék nyilak jelzik (Schultze és munkatársai nyomán (38)).

## 2.3. A PSII központi heterodimer és a cit b559

A funkcionális PSII elengedhetetlen alkotórésze a központi D1/D2 heterodimer, amely számos Chl, Pheo és  $\beta$ -karotin kötése mellett a központi fotoaktív pigmentek és az akceptor oldali kinonok kötéseért is felelős. A D2 fehérje a stabilan kötött elsődleges (Q<sub>A</sub>), a D1 pedig a másodlagos (Q<sub>B</sub>) kinon akceptort köti. A D1 fehérje tehát részt vesz az akceptor-, valamint a 161-es redoxaktív tirozinja és 190-es hisztidinje révén a donor oldali elektrontranszportban is. Ezen kívül a D1 fehérje kulcsfontosságú szerepet tölt be a PSII katalitikus egységének, a víz oxidálásáért felelős Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> fém klaszternek (OEC) a kötésében. Az OEC stabilizálása hidrogénkötésekkel történik, melyet tíz aminosav



oldallánc biztosít; ezek közül 2 a CP43, 8 pedig a D1 fehérjéhez tartozik (29). Mindemellett a D1 alegység kiemelkedő szerepet tölt be a PSII és a fotoszintetikus elektrontranszport védelmében. A PSII komplexben történő vízbontás egy rendkívül erős oxidatív folyamat, amely reaktív oxigén képződését idézheti elő és károsíthatja a komplex alegységeit. Azért, hogy a PSII fénykárosodása ellenére tovább működhessen, egy specifikus javító mechanizmus révén a D1 fehérje gyakran lecserélődik (1.3. ábra).



*Paula Mulo et al. 2009.*

### 1.3. ábra: A PSII fotoaktivitás helyreállításának folyamata

Az OEC ligálásában résztvevő D1 fehérje fénykárosodása esetén az FtsH proteáz specifikusan lebontja azt. Ezt követően a D1 fehérje újraszintetizálódik a transzmembrán komplexben, és poszt-ranszlációs módosításon megy keresztül. A PSII „core” újra összerendeződik, majd a komplex az OEC kötése és dimerizáció útján nyeri el aktív formáját.

Ez az úgynevezett „D1-turnover” a növények esetében például optimális fényviszonyok alatt körülbelül fél óra. Azonban számos stressz hatás befolyásolja a D1 fehérje lecserélődésének gyakoriságát. A D1 „turn-over” aktuális sebessége a transzkript állomány méretének változásával is nyomon követhető. A D1 fehérje folyamatos, gyakori újrászintetizálása egy stabil, viszonylag nagyméretű mRNS állományt igényel, amely cianobaktériumok esetében több *psbA* génről íródik át. Az eddig ismertté vált cianobakteriális genomok nagy részében a PSII alegységek közül a központi heterodimert kódoló gének duplikátumai fennmaradtak. Ezen *psbA* és *psbD* génduplikátumok közül a genomkénti több *psbA* homológ bizonyul a legelterjedtebbnek. Néhány *Prochlorococcus* faj kivételével minden cianobaktérium tartalmaz egy vagy több *psbA* génduplikátumot, tanúsítva a szelekciós előnyt, amit egy *psbA* géncsaláddal rendelkező cianobaktérium élvezhet. Ezt bizonyítja a *Prochlorococcus* sp. és tengeri *Synechococcus* sp. fajok genomkénti több *psbA* génje is. Ezek az oligotróf vizekben élő fitoplankton alkotók drasztikusan redukált genommal rendelkeznek, melynek eredményeként mindegyik faj egyetlen *psbD* kópiával rendelkezik, emellett hiányoznak a más fajokban esszenciálisnak bizonyult PSII alegységek génjei is, mint például a *cit c550*. A hiányos PSII alegységkészlete ellenére számos redukált genomú faj rendelkezik akár több mint 2 *psbA* homológgal (39). Ez a megfigyelés is alátámasztja a *psbA* géncsaládok nyújtotta szelekciós előnyt, amelynek köszönhetően a cianobaktériumok evolúciója során kevés olyan faj maradhatott fenn, amely ne rendelkezne legalább 2 *psbA* homológgal.

### 2.3.1. A cianobakteriális *psbA* géncsaládok és D1 izoformák

A magasabbrendű növények és algák esetében a D1 fehérjét egyetlen *psbA* gén kódolja. Ezzel szemben a cianobaktériumok genomjában általában több *psbA* kópia fordul elő, melyek segítségével ezen fotoszintetizáló baktériumok szélesebb spektrumú D1-en alapuló fotoszintetikus védelemre képesek.

Az egyik D1 fehérjén alapuló védőmechanizmus kvantitatív jellegű: a genom több *psbA* homológot tartalmaz, melyek ugyanazt a fehérje izoformát kódolják. Optimális növekedési körülmények alatt egy *psbA* gén kifejeződése dominál. Stressz hatására azonban indukálódnak az extra kópiák is, így megnövelve a *psbA* mRNS állományt, amely így hatékonyabban képes fedezni a stressz hatására felgyorsult „D1-turnover” szükségletét. Ezt a jelenséget részletesen jellemezték a *Synechocystis* PCC 6803 (továbbiakban:

*Synechocystis*) törzsének esetében, ahol két, azonos D1 izoformát kódoló *psbA* gén közül az egyik magas fényintenzitás, UV-B sugárzás, illetve mérsékelt hőmérsékleti ingadozás hatására indukálódik (40,41).

A másik fajta védőmechanizmus során különböző elsődleges szerkezetű D1 fehérjék cserélődnek le a PSII-ben, megváltoztatva ezzel annak redox tulajdonságait, így optimalizálva a PSII fotoszintézist változó környezeti viszonyok alatt. A D1:1 és D1:2 izoformák különböző stressz válaszokban jelentkező cseréjét *Synechococcus* PCC 7942 (továbbiakban: *Synechococcus*) (42-46), *Anabaena* PCC 7120 (40), *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (47) és *Thermosynechococcus elongatus* (48,49) estében írták le. A közelmúltban egy harmadik D1 izoformát, a D1'-ot is azonosították, melynek feltételezett szerepe az anaerob körülmények hatására előállt eltérő redox környezetben történő fotoszintetikus elektrontranszport optimalizálása. A D1'-ot kódoló *psbA* génről sokáig azt gondolták, hogy egy funkcióját veszített pseudogén, melyről nem történik átírás (50). Később azonban számos fajban, (*Thermosynechococcus elongatus*, *Synechocystis*, *Anabaena* PCC 7120, and *Cyanothece* ATCC 51142) mutatták ki anaerob indukcióját (51-53).

A különböző *psbA* homológok, és az általuk kódolt D1 izoformák *in silico* vizsgálatok alapján történő csoportosítása nehézkes. Az egyes *psbA* gének kifejeződési mintázata között azonban párhuzam vonható, amely funkcionális nevezéktan (9) bevezetését tette lehetővé:

- (1.) D1<sub>m</sub> (m= „major”, fő) névvel látjuk el azokat az izoformákat, amelyek az optimális növekedési (kontroll) körülmények között nagymértékben kifejeződnek, ugyanakkor stressz hatásokra is indukálódnak, tehát mindig a domináns D1 fehérjét képviselik.
- (2.) A D1:1 szintén kontroll körülmények között dominánsan jelen van, azonban stressz hatásokra represszálódik.
- (3.) A D1:2 kontroll körülmények között alacsonyan expresszálódik, stressz válasz esetén azonban indukálódik, és felváltja a D1:1 szerepét a sejtben.
- (4.) A D1' kontroll körülmények között gyakorlatilag nem fejeződik ki, azonban az oxigénhiányos környezet indukálja. A funkcionális nevezéktan alkalmazását a leggyakrabban használt cianobakteriális modellrendszerekre az 1.1. táblázat foglalja össze.

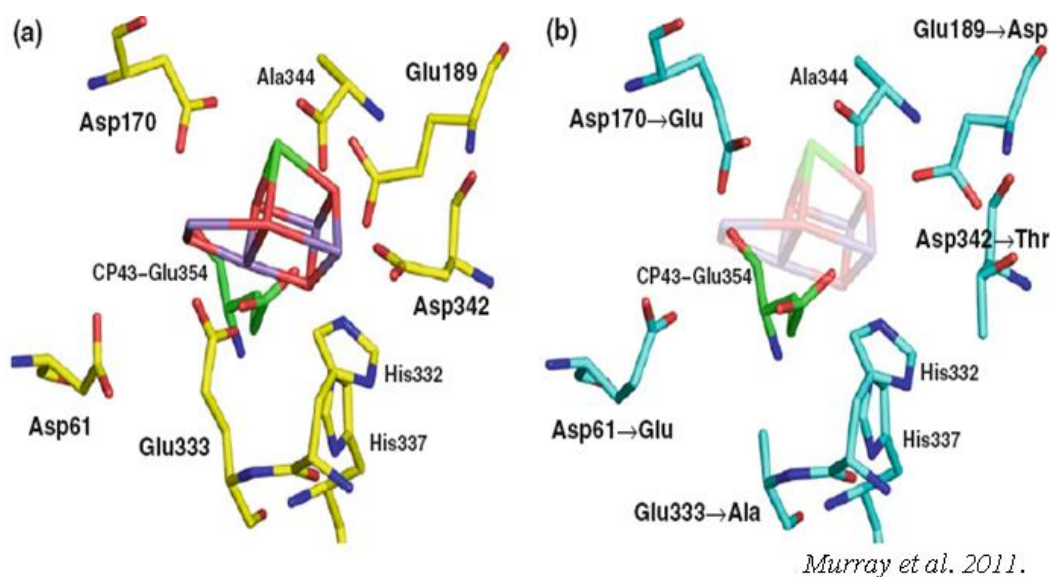
D1 izoformák	D1 <sub>m</sub>	D1:1	D1:2	D1'
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	1 fehérje <i>psbA2</i> <i>psbA3</i>			1 fehérje <i>psbA1</i>
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120		1 fehérje <i>psbA1</i>	1 fehérje <i>psbA2 psbA3 psbA4</i>	1 fehérje <i>psbA0</i>
<i>Thermosynechococcus</i> <i>elongatus</i> BP-1		1 fehérje <i>psbA1</i>	1 fehérje <i>psbA3</i>	1 fehérje <i>psbA2</i>
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942		1 fehérje <i>psbA1</i>	1 fehérje <i>psbA2</i> <i>psbA3</i>	
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	1 fehérje <i>psbA1</i> <i>psbA2</i> <i>psbA3</i>			1 vagy 2 fehérje <i>psbA4 psbA5</i>

*Paula Mulo et al. 2009.*

### 1.1. táblázat: A D1 izoformák funkcionális nevezéktana

A D1 izoformák nomenklatúráját a *Synechocystis*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Synechococcus* sp. PCC 7942 és a *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 törzsekben megfigyelt *psbA* gének kifejeződése alapján állították fel.

A közelmúltban a D1' izoformákat sikerült az elsődleges szerkezetükben jelentkező hasonlóság alapján elkülöníteni. Cosmin Sicora és munkatársai azonosították azt a három konzervatív aminosav cserét, amely minden egyes D1' fehérjében konzekvensen előfordul, azonban más D1 izoformára nem jellemző (52). James Murray a közelmúltban részletes szekvencia analízist végzett a különböző D1 izoformákon, és azon D1 szekvenciákat, melyek lényegesen eltérnek a konszenzustól egy külön izoformaként azonosította, és „rough” D1 (rD1) névvel illette (54). A D1 fehérje nagymértékben hozzájárul az OEC ligálásához (29). A rD1 izoformák esetében számos OEC ligálásban kulcsfontosságú aminosav mutálódott (1.4. ábra), ezért megkérdőjelezhető ezen izoformák működése, melyet eddig még kísérletesen nem bizonyítottak.



#### 1.4. ábra: Aminosav oldalláncok a vízbontó komplex körül a D1 és rD1 izoformák szerkezetében

A konszenzus D1 (a) és a rD1 (b) aminosav szekvenciák alapján felállított *in silico* modell szerint az OEC működésében szerepet játszó aminosav cserék következtében jelentős térszerkezetbeli különbség adódik a két D1 izoforma között. A drasztikusan megváltozott fehérjekörnyezet az rD1 izoformát tartalmazó PSII komplexekben az OEC működőképességét, illetve annak a PSII-höz ligálását megkérdőjelezi.

James Murray fogalmazta meg először azt a feltevést, hogy a rD1 fehérje funkciója az, hogy működésképtelen legyen. Ezen felvetés azon alapul, hogy az oxigénfejlesztő fotoszintézis evolúciója anaerob környezetben indult, amely folyamat úttörői, a cianobaktériumok, a mai napig tartalmazznak olyan enzimeket, amelyek csak oxigénhiányos környezetben működőképesek. Ezen enzimek között találunk olyanokat is, például egyes nitrogénázok, amelyek bizonyos cianobaktériumok számára alapvető fontossággal bírnak. Elképzelhető tehát, hogy amikor az anaerob környezetet igénylő enzim működésére van igény, akkor a PSII oxigénfejlesztő képességét gyorsan és hatékonyan leállítani képes azáltal, hogy elveszi a vízbontó komplex tartópilléreit, azaz a központi D1 fehérjét egy olyan izoformára cseréli ki, amely az OEC ligálást biztosító aminosav oldalláncokban hiányos. Ez első megközelítésben egy abszurd ötletnek hangzik, azonban ha mérlegeljük, hogy a cianobaktériumok a D1 cserére milyen jól berendezkedtek, már sokkal megalapozottabb felvetésnek tűnik. A cianobakteriális sejt számos stressz válasz során

gyors és hatékony D1 cserével optimalizálja fotoszintézisét, amely folyamat speciális proteázokat és chaperonokat igényel, amelyeket külön erre a célra tart fent a sejt. A D1 cseréhez szükséges fehérjekészlet folyamatosan rendelkezésre áll, így a PSII inaktivációhoz szükséges egyéb fehérjék költséges szintetizálása szükségtelen. Elképzelhető tehát, hogy nemcsak PSII optimalizálás, hanem inaktiválás esetén is kevésbé energiaigényes, hatékony és biztonságos megoldás a PSII-t csak részlegesen szétszerelni, és csak a D1 alegységet kicserélni benne. A rD1 izoforma funkciója, illetve, hogy képes lenne-e működőképes PSII alegységként funkcionálni azonban továbbra is nyitott kérdés marad.

### 2.3.2. A cianobakteriális *psbD* gének

A PSII RC heterodimer másik tagját, a D2 fehérjét a növényeknél egyetlen kloroplasztisz gén (*psbD*) kódolja, amely együtt íródik át a CP43 Chl-kötő fehérjét kódoló *psbC* génnel. Cianobaktériumoknál is ilyen bicisztronos mRNS formájában íródik át a *psbD* gén, azonban számos faj tartalmaz egy monocisztronos *psbD* transzkriptet is, amelyről ugyanaz a D2 izoforma transzlálódik. A *psbD-psbC* mRNS konstitutívan, minden fényviszony alatt kifejeződik. Ezzel szemben a *psbC* nélkül átíródó *psbD* homológ promótere fényintenzitás szabályozása alatt áll: gyenge megvilágítás alatt alacsonyan, erős intenzitású fényben magasan expresszál (55), ugyanakkor UV-B sugárzás hatására is indukálódik (56). A fényintenzitás-függő *psbD* transzkripciót részletesen jellemezték a *Synechococcus* modellben, amelyben azonosították a *psbD* génduplikátum szerepét (55). A cianobakteriális *psbD* gének duplikátuma tehát a *psbA* génekhez hasonlóan szelekciós előnyt jelentett, így fennmaradhatott a genomban és az adott fajban.

A cianobakteriális *psbA* géncsaládok akár 2-5 tagúak is lehetnek, és legalább három különböző izoformát kódolhatnak (40,40,42,48,57). Ezzel szemben a *psbD* gének az eddig leírt fajok mindegyikében maximum két kópiában van jelen, amelyek csak egyféle izoformát kódolnak. A *psbA* génekkel ellentétben a *psbD* homológok esetében a valamelyest eltérő tulajdonságokkal rendelkező izoforma használata eddig nem terjedt el, az eddig ismert cianobaktérium fajokban csupán a *psbD* transzkript állomány megnövelését szolgáló duplikátum jelent meg.

### 2.3.3. A cit b559 alegységei és az azokat kódoló gének

A D1/D2 központi heterodimer mellett található a cit b559 molekula, amely  $\alpha$  és  $\beta$  alegységekből épül fel. Mindkét alegység rendelkezik egy-egy konzervált hisztidinnel, amelyek imidazol oldallánca hemcsoport kötéséért felelős. Eddigi ismereteink szerint a hemcsoport-kötő hisztidin a cit b559 működéséhez elengedhetetlen. A cit b559 molekulák szükségesek a funkcionális PSII komplexek felépítéséhez és szerepet játszanak az elektrontranszportban (58). Fontos fotoprotektív szerepet töltenek be azáltal, hogy túltelítő erős fényben kicsatolják a többlet elektronokat a PSI felé menő transzportból. Az elektronokat a PSII körül ciklizálva elterelik az energiafelesleget a lineáris elektrontranszport lánctól (59-63).

Eddigi ismereteink szerint a D1 és D2 heterodimeren kívül a fotoprotektív szerepet ellátó cit b559 alegységei nélkül sem állhat össze funkcionális PSII. Hasonlóképpen, a komplex kis molekulatömegű alegységei, a *PsbJ* és *PsbL*, melyek a PSII belső elektrontranszportját segítik a  $Q_A$  körül, is szükségesek a funkcionális PSII felépítéséhez (64-66). Minden eddig tanulmányozott, PSII-vel rendelkező szervezetben a cit b559  $\alpha$  és  $\beta$  alegységeit kódoló *psbE* és *psbF* gén termékei, a *psbEFLJ* policisztronos mRNS-ben íródnak át. Ez alól egyetlen kivétel ismert, az eukariota zöldalga *Chlamydomonas reinhardtii*, amely genomjában a *psbE* és *psbF* gének egymástól szeparáltan, egy *psbE*, és egy *psbFLJ* átíródási egységben találhatóak (67).

## 2.4. Oxigénfejlesztő fotoszintézis a látható fénytartományon kívül

Hat féle Chl molekulát ismerünk, melyek elnevezése felfedezésük időrendi sorrendjének megfelelően abc sorrendben történt. Körülbelül 70 éve Strain és Manning fedezte fel a negyedik fajta Chl molekulát, a *d*-Chl-t, melynek prekursora az *a*-Chl. Az *in vivo* szintézis során az *a*-Chl molekula 1-es gyűrűjén található vinilcsoport ( $CH_2=CH-$ ) helyére egy aldehidcsoport ( $O=CH-$ ) kerül. Ehhez a biokémiai folyamathoz mindössze egy enzim szükséges, a *d*-Chl szintetáz, és az így kapott pigmentmolekula egyedi spektrummal rendelkezik: *in vivo* abszorpciós tartománya 700-730 nm-ig terjed, ~720 nm-nél jelentkező maximummal (68). Ez az abszorpciós spektrum az eddig azonosított *in vivo* Chl abszorpciók közül a legtávolabbi tartományban található. Egyedül az *e*-bakterioklorofill *in*

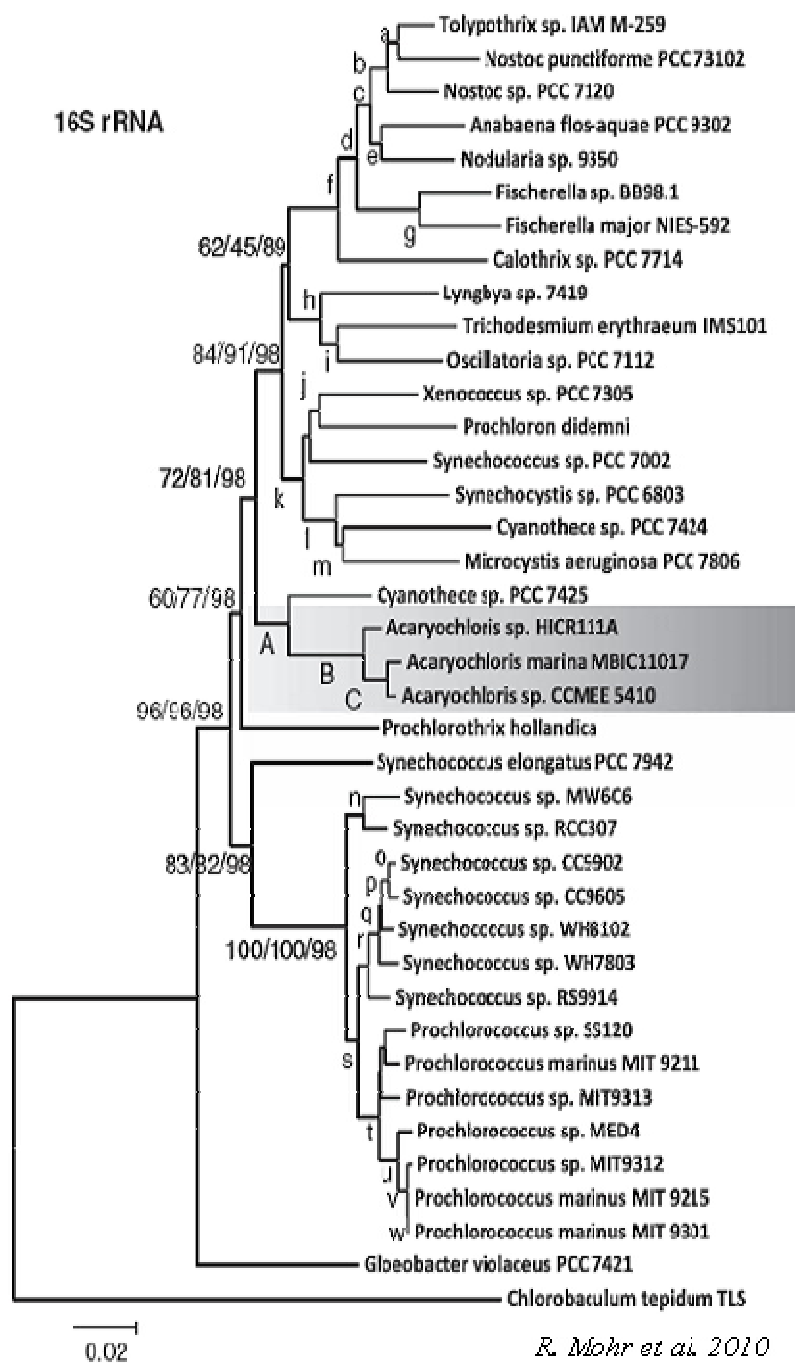
*vivo* abszorpciója fed le hasonló tartományt, azonban az *a*-, *b*- és *c*-Chl molekulák egyike sem képes 700 nm-nél távolabbi vörösben történő fényelnyelésre.

Sokáig azt gondolták, hogy az oxigénfejlesztő fotoszintézist folytató élőlények körében az *a*-Chl, mint elsődleges fotoaktív pigmentmolekula használata általános. Ma már azonban tudjuk, hogy az óceáni *a*-Chl tartalmú elsődleges termelőkhöz képest 1-3%-ban jelen vannak *d*-Chl tartalmú élőlények is (69). A *d*-Chl eredete azonban nem tisztázott. Energetikailag és strukturálisan az ősi anaerob fotoszintetizáló organizmusok pigmentje, az *a*-bakterioklorofill, és a ma élő oxigénfejlesztő fotoszintézist folytató élőlények fő pigmentje, az *a*-Chl között helyezkedik el. Ebből a megállapításból arra lehet következtetni, hogy a *d*-Chl lehetett az a pigment, amely átmenetet képezett az ősi, és a mai fotoszintézis között (70). A közelmúltban egy további Chl fajta létezését is kimutatták a természetben. Cianobaktériumok által létrehozott jellegzetes szerkezetű üledékből, tengeri sztramatolitból izolálták az *f*-Chl-t, melynek metanolos extraktuma 706 nm-en jelentkező fényelnyelési maximummal bír (71). Az eddig azonosított távoli vörösben elnyelő *d*-Chl *in vitro* abszorpciós maximuma is csak 696 nm, tehát az *f*-Chl a legtávolabbi tartományban fényelnyelésre képes Chl. Fiziológiai illetve ökológiai szerepe azonban még nem tisztázott (71).

#### **2.4.1. *d*-klorofill tartalmú cianobaktériumok**

Az oxigénfejlesztő fotoszintézis látható fény hiányában a *d*-Chl-hoz köthető. Napjainkig a bioszférában globálisan jelenlevő *d*-Chl jelenléte az *Acharyochloris* nemzetségbe tartozó fotoszintetikus baktériumokhoz köthető, más *d*-Chl tartalmú organizmust egyelőre még nem találtak. A három ismert *Acharyochloris* (1.5. ábra) közül elsőként az *A. marina* fajt azonosították 1996-ban (10). A proteobaktériumokkal mutatott filogenetikai kapcsolata ellenére végül az *A. marina*-t a számos, cianobaktériumokkal mutatott hasonlóságból kifolyólag ez utóbbiak törzsébe sorolták (1.5. ábra) (72-74).

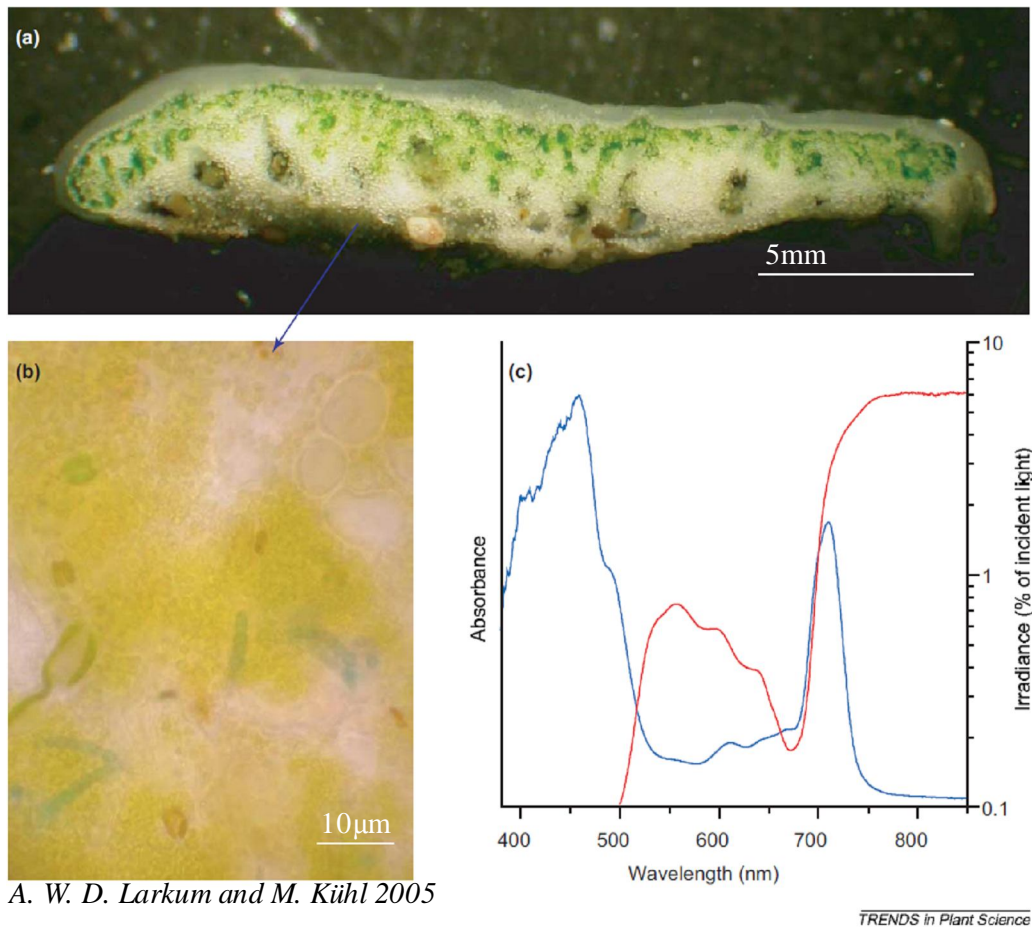




### 1.5. ábra: A cianobaktériumok filogramja

A 16S rRNS szekvencia hasonlóságon alapuló filogramot a zöld kénbaktérium, *Chlorobaculum tepidum*-ra gyökereztetve állították fel (Mohr és munkatársai nyomán (75)).

Az *A. marina* fajt először egy tengeri zsákállat felszínéről izolálták, ahol egy filmréteget képez az állat hasi oldalán, miközben a zsákállat felszínhez közelebbi részében egy „*a*-Chl fotoszintézist” folytató cianobaktérium, *Prochloron* réteg található (1.6/a, b ábra). Az adott életkörülményekből kifolyólag az *A. marina* számára hasznosítható fény intenzitása és tartománya limitált: a zsákállat szövetein, valamint a *a*-Chl tartalmú cianobaktérium rétegen a látható spektrumból elsősorban a távoli vörös fény jut keresztül (76,77) (1.6/c ábra).



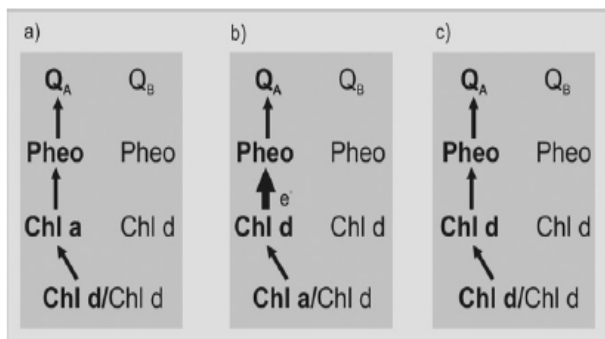
#### 1.6. ábra: Az exoszimbiózisban élő *A. marina* előfordulása a természetben

A gazdaállat *Trididemnum paracyclops* keresztmetszete, felül a zölden látható *Prochloron* sp. réteg, és a gazdaállat hasi oldalán található sárgásszínű *A. marina* sejtek alkotta filmréteg (a), és annak kinagyított képe (b). Az *A. marina* sejtek abszorpciós spektruma (kék görbe), és a gazdaállat testén keresztüljutó fény spektruma százalékban kifejezve (100% = a zsákállat felszínén mért fény) (c).

## 2.4.2. Az *A. marina* fotoszintézise, RC klorofillja

Az *A. marina* reakciócentrumai egyedi *in vivo* abszorpciós maximummal rendelkeznek: PSII 713 nm (P713), PSI pedig 740 nm (P740) (78). Az *A. marina* oly mértékben adaptálódott a távoli vörös fényben gazdag élettérhez, hogy a *d*-Chl-t nemcsak fénybegyűjtő pigmentként használja, hanem a PSI központi Chl-jaként is (79).

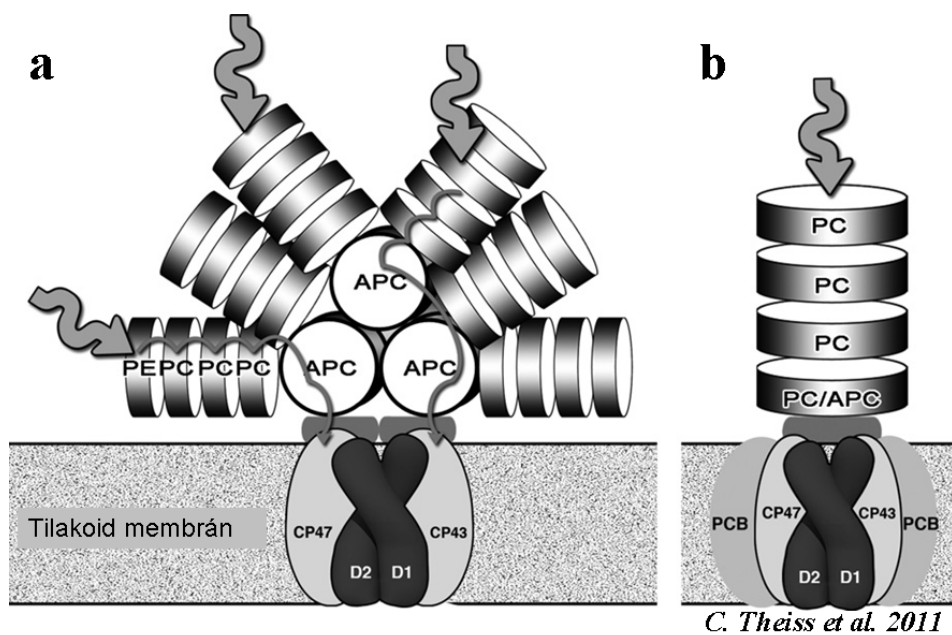
A PSII komplexről azonban még vitatott, hogy *a/a* vagy *d/d*, illetőleg *a/d* a központi Chl párja (80). A *d*-Chl gerjesztett állapota egy alacsonyabb energiát képvisel, ezért kérdéses, hogy a PSII központi *a*-Chl-hoz hasonlóan a *d*-Chl is képes lenne előidézni a vízbontást. Ebből a kérdésből indul ki a PSII központi Chl párjának mibenléte, illetve a komplexben zajló gerjesztési energia-transzfer mikéntjének vitája, amelyből 3 lehetséges modell született (1.7. ábra). Eddig a b) variációt, tudták leginkább kísérletesen, illetve a különböző méréseken alapuló modellekkel közvetve alátámasztani (81). Valószínűsíthető tehát, hogy az elsődleges fotoaktív pigmentmolekula egy *d*-Chl, a vízbontáshoz szükséges oxidáló erőt pedig egy *a*-Chl molekula biztosítja. A *d*-Chl, mint legfőbb pigment mellett az *A. marina* tartalmaz  $\alpha$ -karotint, fikocianint, allofikocianint és *a*-Chl-t. Az *a*-Chl mennyisége nevelési körülményektől függően változik, azonban az össz-Chl mennyiség 1,6-10 %-át nem haladja meg (10,82). A *d*-Chl mennyiséghez képest az *a*-Chl tartalom alacsony fényen lecsökken, magas fényintenzitás hatására pedig megnő. Ha az *A. marina* *a*-Chl-ja járulékos pigment lenne, analóg például egyes algák *b*-Chl-jával, akkor a fényintenzitás-függő mennyiség változását fordítva várnánk, mint ahogy az az *a*-Chl/*b*-Chl tartalmú algáknál megfigyelhető (83). Az *A. marina*-ban nyomokban található *a*-Chl szerepe vitatott. Egyes elképzelések szerint a néhány százalékos *a*-Chl változás annak tudható be, hogy a PSII központi Chl párja változik fényintenzitás hatására, azaz a vízbontás alacsony fényen *d*-Chl, magas fényen *a*-Chl-lal történik (81).



**1.7. ábra: A reakciócentrum Chl pár és a gerjesztési energia útjának modellezése az *A. marina* PSII komplexeiben.** A modellek Tomo et al. (84) a), Schlödder et al. (85) b) és Itoh et al. (86) c) szerint készültek.

### 2.4.3. Az *A. marina* fénybegyűjtő rendszere

Az elsősorban távoli vörös fényt hasznosító *A. marina* is tartalmaz PBP-t, amely lehetővé teszi számára az 500-650 nm hullámhossztartományba eső fény („green gap”) hasznosítását is. A PC és APC tartalmú (PE hiányzik) antennák azonban nem állnak össze a cianobaktériumok nagy részénél megfigyelhető makrostruktúrákká. A sugaras elrendeződésű PBS helyett *A. marina* PBP-jei különálló pálcika alakzatokba rendeződnek össze (1.8. ábra). Ezek a PBP pálcikák négy hexamer alegységet tartalmaznak, amelyekben a PC és APC molekulák random helyezkednek el, és egy külön fehérjén („linker protein”-en) keresztül kapcsolódnak a reakció centrumhoz. A pálcika felépítése analóg a „klasszikus” fikobiliszómákat alkotó sugarasan elhelyezkedő alegységekkel, a fényenergiát pedig a PBS-PSII komplexeknél csaknem háromszor gyorsabban juttatják el a PSII centrumokba (81). Kérdéses, hogy ezek a pálcika alakú PBP antennák egy ősbib eredetre utalnak, vagy az evolúció során a PBS-ből később kialakult „modern” variációi a külső fénybegyűjtő komplexeknek (81).



**1.8. ábra: A cianobaktériumokra általában, illetve az *A. marina*-ra jellemző fénybegyűjtő rendszer összehasonlítása**

A cianobaktériumoknál megfigyelt PBS általában APC, PC és PE fikobiliproteinekből áll (a). Az *A. marina* APC és PC tartalmú, pálcika alakú PBP antennáiból a PE hiányzik (b).

Az *A. marina* belső, membránba ágyazott fénybegyűjtő komplexei a Pcb pigment-fehérjekötő molekulák. Az *A. marina* esetében a Pcb antennák nagymennyiségű *d*-Chl-t tartalmaznak, és a PSII centrumok fénybegyűjtő hatékonyságát képesek akár 200%-kal megnövelni (87). Elektronmikroszkópos felvételek alapján levonható az a következtetés, hogy egy PSII centrumhoz egyszerre mindkettő fénybegyűjtő rendszer, a PBP-k és Pcb antennák egyaránt fizikailag kapcsolódnak (88). PSI-Pcb szuperkomplexet is izoláltak, amely azonban a más cianobaktériumokban megfigyelt PSI-IsiA komplexhez hasonlóan csak vaséheztetés hatására jelenik meg (89).

## 2.5. Biohidrogén termelés cianobakteriális rendszerekben

Az ipar ma óriási mennyiségben használ  $H_2$ -t, és a  $H_2$ -re alapozott technológiák kifejlesztése egyre inkább előtérbe helyeződik. Azonban a felhasznált hidrogén 99 %-át földgázból nyerik, és a legtöbb eljárás során tetemes mennyiségű  $CO_2$ -ot bocsátanak a légkörbe. Ma már elfogadott tény, hogy az ipari forradalom óta az emberiség ugrásszerűen megemelkedett  $CO_2$ -kibocsátása erőteljesen hozzájárult a bolygónkat érő üvegházhatás exponenciális felerősödéséhez; melynek kézzelfogható eredménye a globális felmelegedés, és az egyre gyakoribbá váló természeti katasztrófák. Az utóbbi százötven év során a Föld hőmérséklete  $1^\circ C$ -al emelkedett, amely már közvetlenül befolyásolja életterünköt és gyökeres változtatás nélkül ez a folyamat visszafordíthatatlanná válik. Következésképpen a hagyományos energiahordozókkal való szakítás elsősorban környezetvédelmi megfontolások alapján indokolt. Könnyen belátható tehát, hogy a konvencionális, fosszilis energiákon alapuló hidrogén előállítás helyett alternatív, környezetbarát módszerekre van szükség. A biotechnológiai fejlesztések egyik ága a megújuló forrásokból nyerhető  $H_2$  előállítása fotoszintetizáló rendszerekben. Ez a vízbontáson alapuló módszer magában rejti annak lehetőségét, hogy a fotoszintetizáló élőlényekhez hasonlóan mi is képesek legyünk a nap energiájából akár közvetlenül fedezni energiaigényünket a fényenergia kémiai energiává alakításával. Ez különösen vonzó megoldás, hiszen ezáltal aktívan csökkentenénk a légkör jelenleg túl magas  $CO_2$  tartalmát. Ahhoz azonban, hogy ez a fejlesztés komoly ígéret lehessen a jövő hidrogén alapú gazdasága számára, a fotoszintézis, valamint a hidrogénfejlesztés folyamatáról rendelkezésünkre álló ismereteink bővítése elengedhetetlen. Különös fontossággal bír a fejlesztésben használt két kulcsenzim: a

vízbontásért felelős PSII komplex, és a hidrogenáz enzim működésének részletes tanulmányozása.

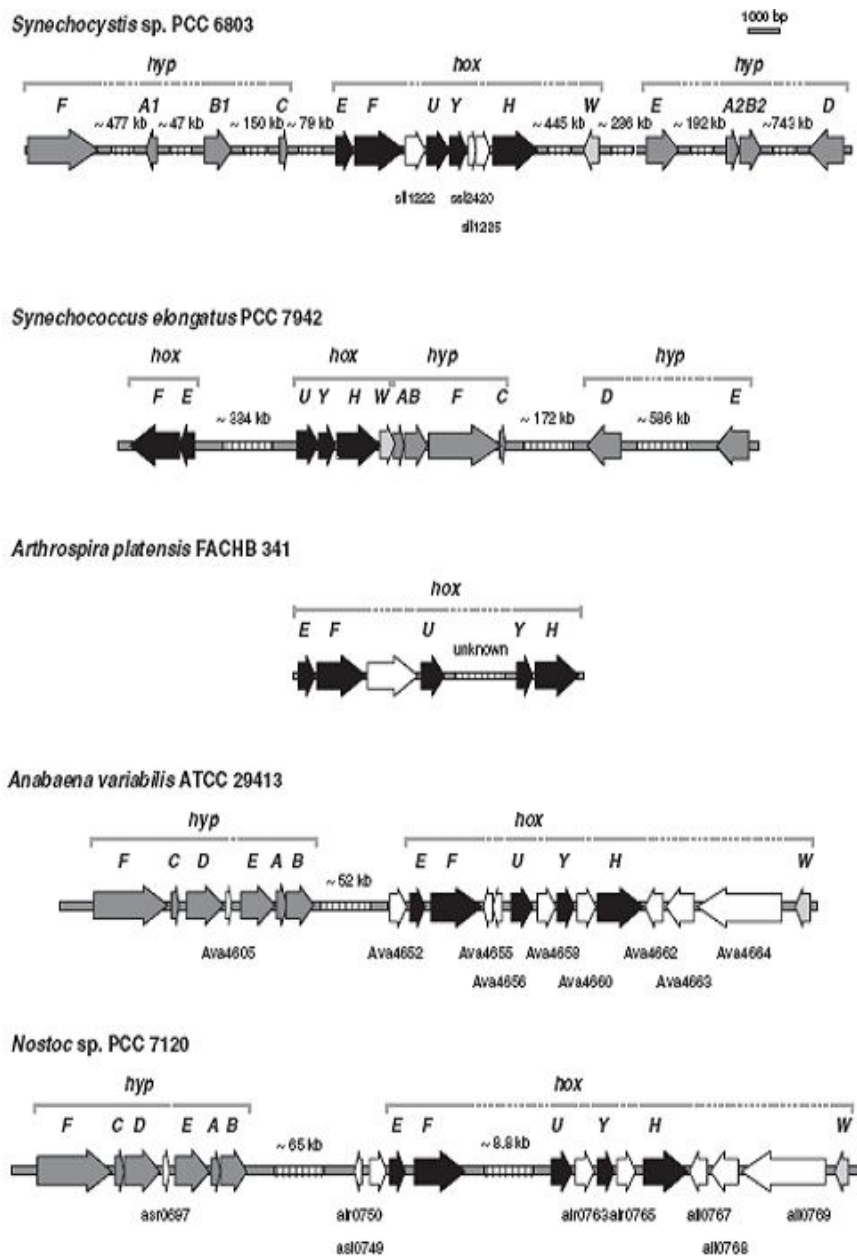
Bolygónkon a hidrogén körforgásában két enzimescsoport, a nitrogénázok és a hidrogenázok kulcsfontosságú szerepet töltenek be. A molibdén, esetleg vanádium tartalmú nitrogénázok a légköri nitrogén fixálása során melléktermékként szabadítanak fel hidrogén gázt. A nitrogénfixálás egy rendkívül energiaigényes reakció, egyetlen molekula  $N_2$  ammóniává redukálásához 16 ATP molekula hidrolízise szükséges. A nitrogénázok a hidrogenázokhoz képest jóval lassabb, és kevésbé hatékony enzimeknek bizonyulnak, ezért biotechnológiai hidrogénfejlesztés szempontjából a hidrogenázok alkalmazása előnyösebb megoldásnak tűnik.

### **2.5.1. A cianobakteriális hidrogenázok**

A cianobaktériumok döntő többsége rendelkezik hidrogenázzal, amely egy a hidrogén előállítás vagy bontás elemi lépéseit szobahőmérsékleten katalizálni képes redox enzim. A hidrogenázok a katalitikus centrum fémtartalmától függően három fő csoportra oszthatók: a Fe-Fe, Ni-Fe, és a fémmentes hidrogenázokra. A cianobakteriális hidrogenázok Ni-Fe tartalmúak. Két fő fajtájuk ismert: az „uptake” és az úgynevezett kétirányú, vagy szolubilis hidrogenáz (90). Az előbbi elsősorban nitrogén megkötésére képes fajokban található, ahol funkciója jól definiált: a nitrogénáz működése útján keletkező mellékterméket, a hidrogént veszi fel, oxidálja és forgatja vissza  $H^+$  és elektron formájában a sejt energiaháztartásába (91). A kétirányú hidrogenáz nevét onnan kapta, hogy a hidrogént reverzibilisen képes oxidálni, tehát bizonyos körülmények között nem hidrogénfelvételt, hanem hidrogénfejlesztést végez. Ez az enzim a nitrogénáz jelenlététől függetlenül fordul elő különböző fajokban. Sejten belüli szerepe nem pontosan definiált, több fiziológiai folyamattal kapcsolatba hozták, úgymint fermentáció, fotoszintézis, vagy respiráció (92-95). A szolubilis hidrogenáz két fő részből áll: egy diaforáz, amely a NAD(P) reverzibilis redukciójáért felelős, és egy hidrogenáz részből, amely a hidrogén protonná és elektronná történő reverzibilis átalakítását végzi. A diaforáz rész a HoxE, HoxF, HoxU, a hidrogenáz rész pedig a HoxY és a HoxH alegységekből épül fel. Az öt strukturális alegységet a *hox* gének kódolják, amelyek elsősorban cianobaktériumokban fordulnak elő, ezért cianobakteriális Hox hidrogenáznak is nevezik. A *hox* gének

elrendeződése (1.9. ábra) és ugyanakkor kifejeződése a különböző fajokban lehet hasonló, vagy eltérő jellegű. Szabályozásában azonosították például a nikkel- és nitrogénéheztetés, vagy a cirkadián ritmus szerepét (96-98). Működését és szabályozását legrészletesebben *Synechocystis*-ben írták le. Ebben a fajban rendkívüli részletességgel meghatározták a hidrogenáz aktivitást befolyásoló tényezőket (99). *Synechocystis* esetében kimutatták a *hoxEFUYH* policisztronos transzkript jelenlétét, valamint azt, hogy a *hoxE* előtti promóter nitrogénéheztetésre aktiválódik. Kimutatták továbbá az enzim szubsztrátja, a hidrogén transzkripciót és enzimaktivitást együttesen indukáló hatását (100). Azonosítottak továbbá kettő, a *hox* operon promóter régiójához kötődő transzkripciósfaktort (101-103). Mindkét regulátorról kiderült, hogy rendkívül sokféle szabályozásban vesz részt (104-106). A Hox sejten belüli lokalizációja fajonként változhat: immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy *Synechococcus* esetében a citoplazmatikus, *Anabaena variabilis*-nál pedig a fotoszintetikus membránnal áll kapcsolatban (91).

A Hox enzim diaforáz alegysége elektronokat továbbít a HoxYH hidrogenáz dimertől a  $\text{NAD(P)}^+$ -ig. A Hox(E)FU alegysége jelentős aminosav szekvencia hasonlóságot mutat az *Escherichia coli*-ban található NADH:ubikinon oxidoreduktáz NADH-t oxidáló NuoEFG alegységével, valamint az emlős egyes-típusú respirációs komplex (NDH-1)  $\text{NAD}^+$  és FMN kötő részével (107). Az NDH-1 14 alegységből áll, azonban cianobaktériumokban és kloroplasztisban csak 11 alegységet tudtak azonosítani (107,108). A hiányzó 3 alegység, és azok promóter régiói jelentős szekvencia hasonlóságot mutatnak Hox(E)FU-val (109). Ez az erős homológia szolgál alapul annak a feltételezésnek, amely szerint a diaforáz alegység a cianobakteriális NDH-1 komplex működésében vesz részt (93,107). Ez az elképzelés azonban továbbra is vita tárgyát képezi (108,110).



Paula Tamagnini et al. 2007.

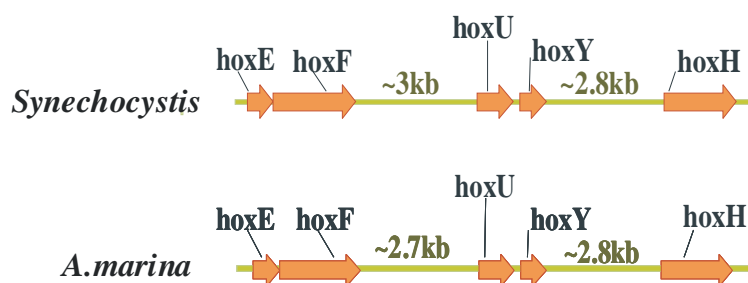
### 1.9. ábra: A *hox* és a *hyp* gének genomi szerveződése a különböző cianobaktérium fajokban

A szolubilis hidrogenáz alegységeit kódoló *hox* gének, és az enzim érésehez szükséges fehérjéket kódoló *hoxW*, illetve *hyp* gének elrendeződése a különböző fajokban.



### 2.5.2. Az *A. marina* Hox hidrogenáza

Oxigénhiányos környezetben tartott *A. marina* kultúrában Boichenko és munkatársai foto-hidrogén fejlődését mutattak ki (111). Az *A. marina* genomjában eddig egyetlen hidrogénfejlesztésre képes enzim, a Hox hidrogenáz génjeit azonosították, így nagy valószínűséggel a fényfüggő hidrogenáz aktivitásért a Hox enzim a felelős. Az *A. marina* genomjában a Hox hidrogenáz öt strukturális génje a *Synechocystis* esetében leírt génelrendeződést követi (1.10. ábra) (13), azonban az utóbbival ellentétben az *A. marina* *hox* génjeinek transzkripció szabályozása nem ismert. A két fajban megfigyelhető analóg génelrendeződés ellenére a *hox* gének genomon belül elhelyezkedése különböző: *Synechocystis* esetében a *hox* operon a kromoszómán, amíg az *A. marina* *hox* génklasztere egy plazmidon található (13).



**1.10. ábra: A Hox hidrogenáz strukturális génjeinek elrendeződése a *Synechocystis* és az *A. marina* genomjában**

A *hox* gének elrendeződése a két törzsben analóg, azonban a *Synechocystis* esetében a *hox* operon a kromoszómán, az *A. marina* *hox* génklasztere a pREB4-es plazmidján helyezkednek el.

### 3. Célkitűzések

Az *A. marina* egy olyan cianobaktérium, amely egyedülálló kromatikus adaptációnak köszönhetően *d*-Chl használatával távoli vörös fény hasznosítására specializálódott. Ezen felül az *A. marina* az első olyan fotoszintetikus organizmus, amely genomjában három *psbA* homológ mellett két *psbE*, valamint két eltérő D2 izoformát kódoló három *psbD* homológ is megtalálható (13). A dolgozatban az *A. marina* adaptációs képességét, illetve a *psbA*, *psbD* és *psbE* homológok kifejeződését, továbbá azok feltételezett szerepét vizsgálatuk. Ezzel kapcsolatban konkrét célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. A laboratóriumi nevelési körülményektől eltérő, azonban az *A. marina* természetes életkörülményeihez hasonlatos hullámhosszú és intenzitású fényviszonyokhoz történő alkalmazkodás során a fotoszintézist, elsősorban a PSII-t érintő változások jellemzése.
2. Az *A. marina* fotoszintetikus akklimációjának transzkripciós vizsgálata elsősorban a PSII RC alegységeit kódoló géneket érinti. Ezen homológok változó környezeti viszonyokra mutatott kifejeződésének meghatározását, és e gének valószínűsíthető funkciójának behatárolása volt a fő célunk.

A megújuló forrásokból nyerhető  $H_2$  előállításának egyik biotechnológiai lehetősége a vízbontáson alapul. Ezen elképzelés szerint a fotofoszforilációból származó elektronok biztosítanák az enzimatisz hidrogénfejlesztéshez szükséges energiát és szubsztrátot. A jelen dolgozatban a vízbontásért felelős PSII komplex központi alegységeinek transzkripciós vizsgálatával párhuzamosan a biotechnológiai szempontból másik kulcsenzim, a Hox hidrogenáz kifejeződését is vizsgáltuk az általunk tanulmányozott modellszervezetekben, és az alábbi célokat tűztük ki:

3. A *hox* gének kifejeződését befolyásoló faktorok azonosítása különböző cianobaktériumokban. Az *A. marina*-ban található Hox enzim valószínűsíthető funkciójának behatárolása. A *hox* génkifejeződés szabályozásának összehasonlítása három különböző fajban (*Synechocystis sp.*, *Synechococcus sp.* és *A. marina sp.*).

## 4. Kísérleti anyagok és módszerek

### 4.1. Nevelési és kísérleti körülmények

Az *A. marina* sejteket K+ES tápoldatban, levegővel buborékolgatva, 25°C-on, 10  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a *Synechocystis*, és *Synechococcus* kultúrákat pedig 30°C-on, 40  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  folyamatos megvilágítás mellett neveltük. Ezeket a körülményeket a továbbiakban nevelési fényként (NF) hívjuk. A kísérleti mintavételek a kultúrák növekedésének exponenciális szakaszában történtek, amikor a minták teljes Chl koncentrációja 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  volt. A Chl koncentrációt etanolos pigment kivonat Shimadzu UV-2550 spektrofotométerrel 696 és 665 nm-en, mért abszorpciójából ( $\text{OD}_{696}$  és  $\text{OD}_{665}$ ) számoltuk *d*-Chl-ra a  $(\text{OD}_{696} \cdot 12.0995) - (\text{OD}_{665} \cdot 0.2006)$ , *a*-Chl-ra a  $(\text{OD}_{665} \cdot 11.978) - (\text{OD}_{696} \cdot 2.3238)$  egyenlet alapján (112).

Alacsony, illetve magas intenzitású fénykezelésekhez (AF, ill. MF) 1 illetve 100  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  megvilágítást használtunk. UV-B stressz előállításához a kultúrákat Vilbert-Lourmat lámpával világítottuk, 312 nm-en jelentkező emissziós maximummal. Az UV-B sugárzást nevelési fény háttérben alkalmaztuk, miközben a kultúra és az UV lámpa közé 0.1 mm vastagságú cellulóz-acetát fóliát helyeztünk, amely csak a B típusú UV fényt engedte át, a C- típusút kiszűrte. A filteren keresztül a kultúra felszínére érkező UV-B sugárzás erősségét 7  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -ra állítottuk.

A távoli vörös megvilágításhoz a 720 nm hullámhosszú fényt az *A. marina* természetes élőhelyén előforduló fényviszonyok alapján választottuk (76). A 720 nm-es megvilágítást keskeny emissziós spektrumú fénydiódával biztosítottuk (IR 720 nm dióda, Roithen Lasertechnik GmbH), intenzitását 0.18  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (110  $\mu\text{W}$ ) erősségűre állítottuk. Ez az intenzitás megfelel a nevelési körülmények során alkalmazott látható fényben jelenlevő 720 nm-es fotonok mennyiségének, melyet 720 nm-re állított intenzitásmérővel (OPHIR Laser Measurement Group, ORION-PD P/N 1Z01803) mértünk. Az általunk használt távoli vörös megvilágítás tehát abban különbözik a kontroll (nevelési) fényviszonyoktól, hogy a 720 nm-en kívül eső fénytartományt gyakorlatilag kiszűrtük.

Alacsony oxigén koncentrációjú környezetet ( $< 1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) argonos buborékolgatással, valamint enzimatis úton, 5 mM glükóz, 200 U glükóz oxidáz és 2000

U kataláz használatával érték el. Az anaerob kezelések folyamán a táptalaj oldott oxigén tartalmát oxigén elektróddal (Presens, Fibox 3) folyamatosan ellenőriztük.

A fotoszintetikus elektrontranszportot a cit  $b_6f$  komplex oldalán  $20\ \mu\text{M}$  dibromotimokinonnal (DBMIB); a PSII akceptor oldalán pedig  $10\ \mu\text{M}$  3-(3,4-Diklorofenil)-1, 1-dimetilureával (DCMU) gátoltuk.

#### **4.2.A klorofill fluoreszcencia mérése**

A változó Chl fluoreszcencia indukciót, azaz OJIP tranzienst  $10\ \mu\text{s} - 1\ \text{s}$  időintervallumban gyors fluoriméterrel (FL 3500/F, PSI, Cseh Köztársaság) mértük. A méréseket  $1\ \text{ml}$  térfogatú sötétadaptált mintán végeztük, műanyag küvettában, amelyet speciális mintatartóban helyeztünk el a mérés, illetve az azt megelőző sötétadaptáció ( $3\ \text{min}$ ) során. A gerjesztés  $640\ \text{nm}$  hullámhosszú,  $1000\ \mu\text{mol foton m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  intenzitású fénnel történt. Az így kapott OJIP tranzienst logaritmikus skálán ábráztuk. Az első mérési pontot  $10\ \mu\text{s}$ -nál vettük fel. A biológiai kísérleteket, amelyekből az OJIP mérések származnak minimum háromszor ismételtük.

#### **4.3. Relatív mRNS szintek meghatározása kvantitatív RT-PCR módszerrel**

Az össz-RNS kivonásához  $10\ \text{ml}$ ,  $100\ \mu\text{g}$  Chl tartalmú kultúrát használtunk. A sejteket centrifugálással ( $10\ 000\ \text{g}$ ) üleptítettük; és  $0,3\ \text{M}$  szacharóz,  $10\ \text{mM}$  nátrium-acetát és  $75\ \text{M}$  etilén-diamin-tetraecetsav tartalmú oldattal ( $\text{pH } 4.5$ ) mostuk, és ugyanebben a pufferben  $250\ \mu\text{l}$  végtérfogattal szuszpendáltuk fel. A sejteket folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és  $4\ ^\circ\text{C}$ -on felolvasztottuk. Ezt a lépést 3-szor ismételtük, majd az össz-RNS kivonást a „forró-fenol” protokoll szerint folytattuk (113). Az RNS mintákból az esetleg még jelenlevő kis mennyiségű genomi DNS-t Náz (AMBION) kezeléssel távolítottuk el. Az RNS minták átírásával cDNS-t szintetizáltunk; ehhez H-MuLV (Fermentas) reverz transzkriptáz enzimet használtunk, a gyártó cég előírásai alapján random hexamer primerekkel. Az így kapott cDNS mintákat használtuk fel templátként a  $2\times\text{Power SYBR Green Master Mix}$  (Applied Biosystems), és  $3\ \text{pmol}$  gén-specifikus oligonukleotid primer (3.2. táblázat) tartalmú Q-PCR reakcióban, melynek végtérfogata  $20\ \mu\text{L}$  volt. A P-típusú RNáz B alegységét kódoló gén (*rnpB*) kifejeződése konstitutívnak tekinthető, ezért belső

kontrol génként használtuk. Azaz, minden mérési pont gén-specifikus primerekkel kapott  $C_T$  értékét az ugyanazon a mintán, ugyanabban a mérési pontban az *rnpB* primerrel kapott  $C_T$  értékre normáltuk ( $2^{-\Delta CT}$  módszer). Az így kapott relatív (*rnpB* transzkript szinthez viszonyított) mRNS mennyiségekből számoltuk a *psbA* illetve *psbD* homológok egymáshoz viszonyított százalékos eloszlását, valamint a *psbE* és *psbF* transzkriptek relatív mennyisége között jelentkező különbséget. Amikor bizonyos kezelésre jelentkező génkifejeződés változását mutatjuk be, akkor az *rnpB* mennyiséghez viszonyított mRNS mennyiségeket tovább normáltuk a kalibrátorra, azaz a kontrol mintára ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszer). A mi kísérleti rendszerünkben kontrol mintának a növekedési fényen (NF) nevelt kezeletlen minta felel meg. Az ezzel a módszerrel nyert adat úgy értelmezhető, mint „az érdeklődés középpontjában álló gén belső kontrol génhez mért relatív kifejeződése a kezelt mintában a kezeletlen mintához képest” (114). A  $2^{-\Delta CT}$  illetve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszer a PCR reakció 100 %-os hatékonyságát feltételezi. Annak érdekében, hogy figyelembe vehessük az amplifikáció valós hatékonyságát, a fent említett módszert a GED (Gene Expression's  $C_T$  Difference) formulával módosítottuk (115). A detektált fluoreszcencia intenzitása és az időegység alatt szintetizálódott PCR termék mennyisége közötti párhuzam felállítása során figyelembe vettük az esetlegesen különböző termék hosszából adódó fluoreszcencia intenzitás eltéréseket. Minden mérési pont és a hozzá tartozó szórás legalább hat ismétlés átlagából ered, amelyből legalább három egymástól független kísérletből származik.

Gén	irány	Szekvencia (5' - 3')
<i>AM_psbA1</i>	Forward	TTCCGGCACCTTCCACTTTA
<i>AM_psbA1</i>	Reverse	TTCCTGAACCAAGCTGGAGG
<i>AM_psbA2</i>	Forward	AACTGCTTCTGTTTAATACAAATTCATACTTC
<i>AM_psbA3</i>	Forward	CATAGCTTTTAAGTTTGTCCCGTAGT
<i>AM_psbA2, psbA3</i>	Reverse	TGTAGGAATCATCAATACGCCG
<i>AM_psbD1</i>	Forward	CAATTTTAAAGTTAGATCAAGAGGGTTTATT
<i>AM_psbD2</i>	Forward	TCCTGCAATCATTTTTCGATTATATAA
<i>AM_psbD1, psbD2</i>	Reverse	AAAGTTGTGCCGGTAAACCATC
<i>AM_psbD3</i>	Forward	GCTGATTGGTTTTATGCTGCG
<i>AM_psbD3</i>	Reverse	GGGAGCAAAGAACCAACTGG
<i>AM_psbE1</i>	Forward	TCACCGATTTCTCTTTCTGGAAG
<i>AM_psbE1</i>	Reverse	CAATTTGTATTTGAGACTCAGATTGAGAAT
<i>AM_psbE2</i>	Forward	TTTGGTGATATCGTTACAAGCATTC
<i>AM_psbE2</i>	Reverse	AGCCCTTGTCGAGCTTGGT
<i>AM_psbF</i>	Forward	GACCTCCCCAAAGGAAATATCC
<i>AM_psbF</i>	Reverse	AATCATCGTTGGGGCAACTG
<i>AM_rnpB</i>	Forward	TCTCGAAAGGCCAGACTTGC
<i>AM_rnpB</i>	Reverse	TTGCTGGTGCGCTCTTACC
<i>AM_hoxE</i>	Forward	AGGCTCAGGAATTGTTTCGGA
<i>AM_hoxE</i>	Reverse	CAAACACACAGGTATGGCGT
<i>AM_hoxF</i>	Forward	TCCCTTTGACTTTTCGGATCG
<i>AM_hoxF</i>	Reverse	TGGACAACCCAGAGTCCAG
<i>AM_hoxU</i>	Forward	CGACGCTATGCAACTTGCAG
<i>AM_hoxU</i>	Reverse	TGTTTAAGCCGTTTGGTTTGG
<i>AM_hoxY</i>	Forward	GCGATTGTCCCCCTTTATT
<i>AM_hoxY</i>	Reverse	GACCCTCGAGTTGAGGCCTC
<i>AM_hoxH</i>	Forward	CGGATGCTCGATTTTCATGTG
<i>AM_hoxH</i>	Reverse	ATCTGGTCTCCAGCTTTCGC
<i>6803_hoxE</i>	Forward	CACCATGAAGCGCAACCA
<i>6803_hoxE</i>	Reverse	TGCAGGATTTCAATGAGGGC
<i>6803_hoxF</i>	Forward	CTGCAATGCTGACGAAGGC
<i>6803_hoxF</i>	Reverse	AACACACTGCGGTCCATGAA
<i>6803_hoxU</i>	Forward	GTGGTTTTTCAGTCCCGTTGG
<i>6803_hoxU</i>	Reverse	TAAGCCACATCCCAAACGTG
<i>6803_hoxY</i>	Forward	GTGGTTTTTCAGTCCCGTTGG
<i>6803_hoxY</i>	Reverse	CCACATTGTCCGGGTATTCCT
<i>6803_hoxH</i>	Forward	AAATTACCCAATCCCACGCC
<i>6803_hoxH</i>	Reverse	AATCAGGACTGCTGAGATGGAAA
<i>6803_rnpB</i>	Forward	TTACCCAGCAAGTTTGGCCT
<i>6803_rnpB</i>	Reverse	GAGTTGCGGATTCCTGTCACA
<i>7942_rnpB</i>	Forward	GTAAGAGCGCACCAGCAACA
<i>7942_rnpB</i>	Reverse	ATAAACGGAACAGGTAAAAGACCAA
<i>7942_hoxE</i>	Forward	TTATCTCGATCGCGAGCTCC
<i>7942_hoxE</i>	Reverse	ACATAGCAGGCCGTGCCTAG
<i>7942_hoxF</i>	Forward	CAGCGATGGATCTACCCGAA
<i>7942_hoxF</i>	Reverse	AAGATGGTGTGCATGAAAGCC
<i>7942_hoxU</i>	Forward	TGTGTGGCCAATGGCAATT
<i>7942_hoxU</i>	Reverse	GCGTACAGAGAATGCAGCGAT
<i>7942_hoxY</i>	Forward	CGATCTCTGCCTGATTGAAGG
<i>7942_hoxY</i>	Reverse	GATTCAGCCCCCAGAGATT
<i>7942_hoxH</i>	Forward	CGCTTTGTTGATAGCCAAGGA
<i>7942_hoxH</i>	Reverse	CAACCCGATACATCCCCTCA

### 3.2. táblázat: A kvantitatív PCR reakcióban használt oligonukleotid szekvenciák

A génspecifikus primerek az *A. marina* (AM) *psbA*, *psbD*, *psbE*, *psbF*, *rnpB*, és *hox*; valamint a *Synechocystis* (6803) és *Synechococcus* (7942) *rnpB*, és *hox* génekre terveztük.

#### 4.4. A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése

A kultúrák oxigénfejlesztő, illetve respirációs aktivitását intakt sejteken, Clark-típusú oxigénelektóddal mértük (Instruments, Kings Lynn, Egyesült Királyság). Az elektródot a mérések előtt levegővel, illetve argonnal telített vízzel kalibráltuk. A minták Chl tartalma  $8 \mu\text{gml}^{-1}$  volt, 2 ml térfogatban. A respirációs kinetikát 10-15 perces sötétadaptálás alatt mértük, majd telítési fényt kapcsoltunk a kultúrákra és a 1.5-3 perces megvilágítás során rögzítettük az oxigénfejlesztés telítési görbáját. A telítési fényt *Synechocystis* esetében 1500, *A. marina* esetében pedig  $700 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitásúnak határoztuk meg. A mérési adatokból az oxigén koncentrációjának időbeli, Chl tartalomra normált változását számoltuk. Az oxigénfejlesztést a teljes lineáris elektrontranszport láncra ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2$ ), valamint csak a PSII oxigénfejlesztő képességére vonatkozóan is mértük. Az utóbbi esetben mesterséges, a PSII akceptor oldalán működő elektron akceptor, 0.5 mM 2,6-dimetilbenzokinon (DMBQ) hozzáadása volt szükséges. A DMBQ molekulákat 1 mM kálium ferri-cianiddal  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  oxidáltuk vissza, így biztosítva egy folyamatos erős oxidálószer állományt a PSII-nek. Minden mérési pont és a hozzá tartozó szórás 10-20 mérésből ered.

#### 4.5. *In silico* fehérje analízis

Az *A. marina* D1, D2, PSII-E szekvenciáit a Cyanobase adatbázisból (13), a HoxU fehérje szekvenciákat pedig szintén a Cyanobase, valamint az NCBI (116) protein adatbázisából töltöttük le. A HoxU filogenetikai analíziséhez felhasznált szekvenciák listáját a 3.3. táblázat tartalmazza. Az aminosav szekvenciák többszörös illesztését („multiple alignment”) a CLUSTALW (117) programcsomaggal végeztük. A HoxU fehérje törzsfá a „maximum likelihood” elv alapján a PhyML, a fák grafikus megjelenítése pedig a Dendroscope internetes bioinformatikai programcsomag felhasználásával készült (118,119).

Rövidített fajnév	Laboratóriumi törzs	szekvencia azonosító
Calditerrivibrio	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i> DSM19672	ADR19458 (NCBI)
Thiocapsa	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	AAP50521 (NCBI)
Desulfotalea	<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54	YP_065946 (NCBI)
Anaerolinea	<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1	YP_004173887 (NCBI)
Desulfobulbus	<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032	ADW18216 (NCBI)
Candidatus	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellin6076	YP_826258 (NCBI)
Geob_lovleyi	<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	YP_001953026 (NCBI)
Geob_sulf	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	NP_953765 (NCBI)
Geob_metal	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	ABB31351 (NCBI)
Syntrophobacter	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	YP_846827 (NCBI)
Roseiflexus	<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941	YP_001431480 (NCBI)
Chloroflexus	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl	YP_001634805 (NCBI)
Oscillochloris	<i>Oscillochloris trichoides</i> DG6	ZP_07685959 (NCBI)
A. marina	<i>Acaryochloris marina</i>	AM1_D0182 (cyanob.)
Ana_29413	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Ava_4657 (cyanob.)
Ana_7120	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	alr0762 (cyanob.)
Nodularia	<i>Nodularia spumigena</i> CCY9414	ZP_01629501 (NCBI)
Nostoc7422	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7422	BAE46794 (NCBI)
Syncc. 7002	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	YP_001733466 (NCBI)
Cyan.8801	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	YP_002370359 (NCBI)
Cyan. CCY0110	<i>Cyanothece</i> sp. CCY0110	ZP_01727421 (NCBI)
Cyan.51142	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	YP_001803733 (NCBI)
Cyan.7425	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	YP_002484726 (NCBI)
6803	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	sl11223 (cyanob.)
Cyan.7424	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424	YP_002379402 (NCBI)
MAE	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	MAE57970 (cyanob.)
Arthrospira p.	<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	NIES39_L04040(cyanob.)
Lyngbya	<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	EAW35891 (NCBI)
Syncc.5701	<i>Synechococcus</i> sp. WH 5701	ZP_01085932 (NCBI)
Syncc.CB01	<i>Synechococcus</i> sp. CB0101	ZP_07973078 (NCBI)
Syncc .7942	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Synpcc7942_2557(cyanob.)

### 3.3. táblázat: A HoxU filogenetikai analíziséhez felhasznált szekvenciák

A 4.15-ös ábrán bemutatott rövidített nevek mellett szerepel a különböző törzsek teljes elnevezése, valamint az NCBI és a Cyanobase adatbázisokban az adott aminosav szekvenciához rendelt azonosító kód.



## 5. Eredmények

### 5.1. A fotoszintetikus akklimáció fiziológiai megnyilvánulásai

A prokarióta sejt rendkívül gyorsan képes alkalmazkodni a változó környezethez. A sejt redox egyensúlyának kibillenését a kifinomult redox szabályozás szenzorai azonnal érzékelik, és számos adaptációs folyamatot indíthatnak el, mint például egyes gének aktivációját/inaktivációját. Az autotróf prokarióta szervezetekben a fotoszintézis, illetve az abban résztvevő komponensek redox állapotának változása egy kulcsfontosságú szabályozási mechanizmus alapját képezi. A jelen dolgozatban vizsgált gének transzkripciók szabályozásának közvetett vagy közvetlen kapcsolatát a fotoszintetikus elektrontranszporttal számos tanulmány vizsgálta (120-124). Ezek alapján elmondható, hogy a fotoszintetikus gének transzkripciójában beálló változások előzménye általában egy elektrontranszport-hoz köthető változás. Az akklimációs, stressz-adaptációs folyamatok során a fotoszintetikus elektrontranszport eseményeit számos módszerrel követhetjük nyomon. A jelen dolgozat a gyors Chl fluoreszcencia tranziens (OJIP) módszerrel jellemzi a vizsgált körülmények hatására bekövetkező változásokat az elektrontranszport szintjén. A cianobaktériumok fotoszintézisének optimalizálásában (például pigment összetételük módosításában, a kromatikus akklimációban) olyan folyamatok is szerepet játszhatnak, amelyek igen hosszú időtartamon keresztül valósulnak meg, esetenként több sejtgenerációra terjednek ki. Az *A. marina* különböző fényviszonyokhoz való alkalmazkodása során végbemenő transzkripciók változásokkal párhuzamosan Chl fluoreszcencia, fotoszintetikus aktivitás, valamint abszorpciós spektrum változásokat követtünk nyomon.

### 5.1.1. A PQ állomány redukálásának nyomon követése Chl fluoreszcencia méréssel

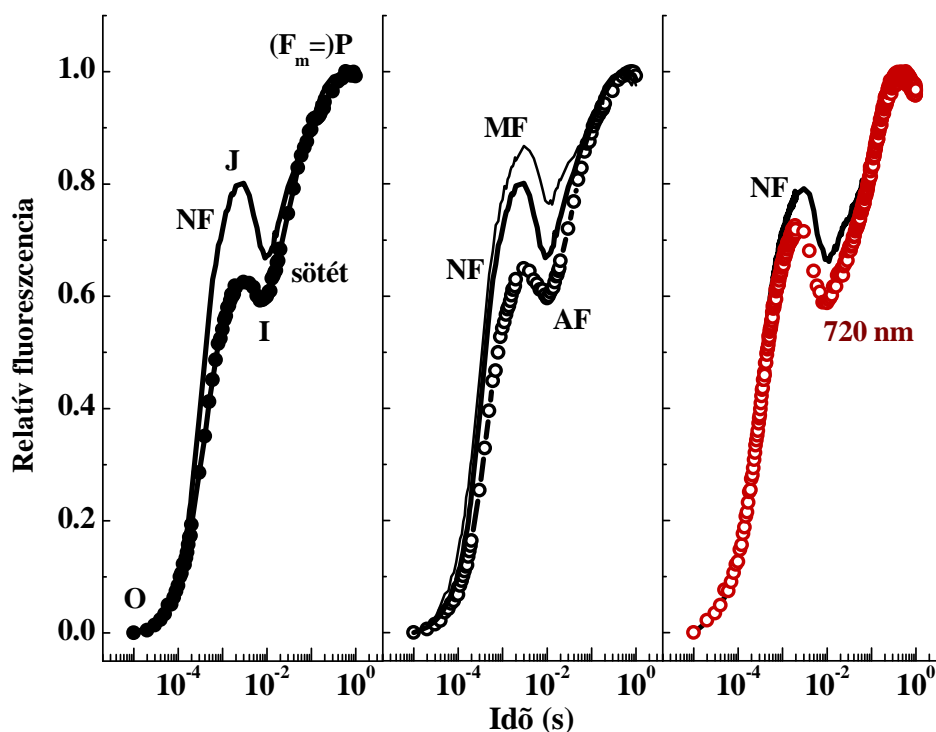
A PSII víz:plasztokinon foto-oxidoreduktázként működik, ezért szubsztrátja, az oxidált plasztokinon molekulák elérhetősége az enzim-komplex működését nagymértékben befolyásolja. A plasztokinon molekulák állományában (PQ pool) az oxidált és redukált PQ molekulák aránya a fotoszintézis optimalizálása során egy egyensúlyi állapot felé mozog. Az elektrontranszport egyensúlyának kibillenése - amelyet például kiválthat a PSII és PSI RC-ok egyenlőtlen gerjesztése - a PQ/PQH<sub>2</sub> arányban azonnal megmutatkozik, ezért számos fotoszintézist szabályozó mechanizmus irányítása PQ redoxállapot-függő. A fotoszintetikus mechanizmusok jelentős részének szabályzása a gének kifejeződésének szintjén történik. A cianobaktériumok a változó környezethez történő akklimációjuk során optimalizálják fotoszintézisüket, amelyhez a megfelelő gének aktiválása, illetve inaktiválása PQ-on keresztül történő szabályzás révén valósul meg. Mind a közvetlen elektrontranszport optimalizálásban, mind a közvetett transzkripciós és translációs szabályozási lépésekben a PQ pool tehát kulcsfontosságú mediátorként vesz részt (32,120,125,126).

Laboratóriumi körülmények között az *A. marina* kultúrákat 10  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  intenzitású látható fénnel folyamatosan megvilágítva neveljük. Ezzel szemben az *A. marina* természetes élőhelye távoli vörös fényben gazdag, és a sejtek csak alacsony intenzitású fényhez juthatnak. Az *A. marina*-nak a jelentősen eltérő környezethez, elsősorban más fényviszonyokhoz történő akklimációját tanulmányoztuk, és ennek során a PQ pool redukáltsági szintjének vizsgálata alapvető fontossággal bírt. A redukált (PQH<sub>2</sub>) és oxidált kinon (PQ) molekulák arányát viszonylag egyszerűen és megbízhatóan meghatározhatjuk változó Chl fluoreszcencia méréssel és további hasznos információhoz juthatunk az elektrontranszporttal kapcsolatban.

PSII komplexekből eredő Chl fluoreszcenciát figyelhetünk meg fiziológiás hőmérsékleten sötét adaptált fotoszintetikus minta gerjesztése során (127). Az *A. marina* elsősorban *d*-Chl-t használ fotoszintetikus fényhasznosításra, és a cianobaktériumoknál elterjedt PBS fénybegyűjtő antenna rendszer helyett egy leredukált perifériális PBP antennával rendelkezik. Ezért ha intakt *A. marina* sejtek látható tartományban gerjesztődnek, akkor elsősorban PBP-mediált *d*-Chl fluoreszcenciát mutatnak (128).

Az általunk alkalmazott OJIP típusú változó Chl fluoreszcencia tranziens mérése

esetén folyamatos megvilágítás alatt a fluoreszcencia indukció az  $F_o$  alapszintről emelkedik. Ez a kezdeti  $F_o$  a sötétadaptált, nyitott PSII centrumokat tartalmazó fotoszintetikus mintára jellemző fluoreszcencia érték. Az  $F_o$  szintjéről a fluoreszcencia fokozatosan emelkedve, 300 ms alatt eléri maximumát, a P szintet. Az  $F_o$  és P között megfigyelhető két átmeneti szint: kb. 2 ms-nál J és 20 ms-nál I (4.1/a ábra). A fluoreszcencia intenzitása J és I szinteken a PSII belső elektrontranszportjában a  $Q_A$  és  $Q_B$  akceptorok, valamint a PQ pool redukálását tükrözik (128,129). Az OJ kezdeti felfutás a  $Q_A$  redukcióját mutatja, melyet elsősorban a  $PQH_2/PQ$  arány befolyásol. Minél magasabb ez az arány a gerjesztő fény reakciócentrumba érkezése előtt, annál magasabbra futhat fel a fluoreszcencia jel a J szinten (130). A különböző fényviszonyokon tartott *A. marina* kultúrákban a fluoreszcencia relatív intenzitása a J szinten eltérő volt. Ahhoz, hogy e különbségeket számszerűen tudjuk jellemezni, a változó fluoreszcencia J szinten mutatott relatív értékét a  $F_{v,j} = (F_j - F_o) / (F_{max} - F_o)$  összefüggésből számoltuk, ahol  $F_o$ ,  $F_j$  és  $F_{max}$  a mért fluoreszcencia intenzitások a kiindulási- és a J szinten, valamint a P maximum pontban. Három órás sötétadaptációt követően a  $F_v$ -hez viszonyított J szinten mért fluoreszcencia intenzitás  $9 \pm 1$  %-kal alacsonyabb értéket mutatott azokhoz a kultúrákhoz képest, amelyek csak a mérés előtt három percig voltak sötétadaptálva (4.1/a ábra, 4.1. táblázat). Ez a  $F_{v,j}$  csökkenés azt mutatja, hogy a sötétadaptáció során a  $PQH_2/PQ$  arány lecsökkent, azaz sötétben a PQ pool fokozatosan kioxidálódik. A cianobaktériumok döntő hányadánál ez fordítva történik: sötétadaptáció alatt az NDH komplex elektronokat tölt a PQ pool-ba, ami a PSI működésének hiányában redukálódik (33). A sötétben tapasztaltakhoz hasonlóan, akkor is lecsökken az  $F_{v,j}$  értéke ( $13 \pm 4$  %-kal) ha az *A. marina* kultúrákat érő megvilágítás intenzitását a nevelési fényről ( $10 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) lecsökkentjük ( $1 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Ez annak tudható be, hogy a PSII Chl gerjesztése a kevesebb foton beérkezése miatt kisebb gyakorisággal fordul elő, így a PQ pool-ba betáplált elektronok mennyisége kevesebb, mint amit a PSI az egyéb PQ pool-t oxidáló enzimekkel együttesen a kinol molekuláktól elvonni képes. Ezzel szemben, ha megnöveljük a megvilágítás intenzitását ( $100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a J szint  $7 \pm 1$  %-kal emelkedik a kontrol mintához képest (4.1/b ábra, 4.1. táblázat), tehát gyakoribb PSII gerjesztéssel a PQ redukálási/oxidálási aránya a redukáló utak irányába tolható.



**4.1. ábra: Az *A. marina* sejteken mért OJIP tranziensek**

Három órán keresztül sötétben (fekete teli kör), magas (MF, vékony vonal) és alacsony (AF, fekete üres kör) fényintenzitáson, 720 nm hullámhosszú távoli vörös (720 nm, piros üres kör) és nevelési fényen tartott (NF, vastag fekete vonal) kultúrák kétszeresen normált OJIP tranziens görbéi. A görbéket közös kiindulási pontba toltuk (=0), és a maximum pontjukra normáltuk (=1).

Fénykezelés	$\Delta F_{v,j}$
NF $\rightarrow$ sötét ( $F_{v,j,sötét} - F_{v,j,NF}$ )	$-0.09 \pm 0.01$
NF $\rightarrow$ AF ( $F_{v,j,AF} - F_{v,j,NF}$ )	$-0.13 \pm 0.04$
NF $\rightarrow$ MF ( $F_{v,j,MF} - F_{v,j,NF}$ )	$+0.07 \pm 0.01$
NF $\rightarrow$ 720 ( $F_{v,j,720} - F_{v,j,NF}$ )	$-0.07 \pm 0.01$

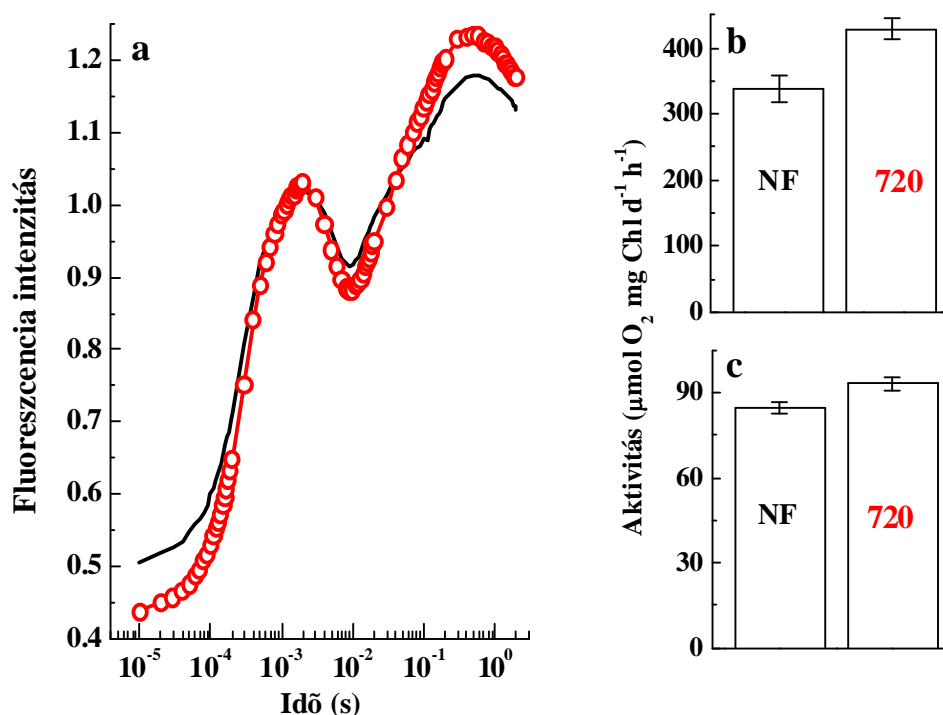
**4.1. táblázat: A változó fluoreszcencia intenzitás különböző fényviszonyok hatására jelentkező különbségei a J szinten**

A különböző mintákra jellemző relatív  $F_{v,j}$  értékeket az  $F_{v,j} = (F_j - F_o) / (F_{max} - F_o)$  összefüggésből számoltuk. A mérés előtt 3 órás sötét-, AF-, MF-, 720 nm-es fényadaptált minták  $F_{v,j}$  értékéből a növekedési fényen tartott (kontrol) minta  $F_{v,j}$  értékét kivonva kaptuk az eltérő körülményekre jellemző  $\Delta F_{v,j}$  értékeket.

Az *A. marina* sejtek *in vivo* abszorpciós maximuma 720 nm körül jelenik meg (megfigyelhető a 4.4. ábrán). Elmondható tehát, hogy az *A. marina* számára a távoli vörös a legjobban hasznosítható fénytartomány. Ha csak 720 nm körüli szűk spektrumú fénnel világítjuk meg a kultúrákat, amelynek intenzitása megegyezik a fehér növekedési fényben 720 nm-en mérhető intenzitással, akkor szintén a J szint relatív csökkenését tapasztaljuk. A távoli vörös fény hatására jelentkező, a kontrol mintához képest mért  $7 \pm 1$  %-os  $F_{v,j}$  csökkenés alapján elmondható, hogy a PQ pool oxidáltabbá válik, ha a 720 nm a kizárólagosan előforduló hasznosítható fény tartomány (4.1/c ábra, 4.1. táblázat). Ugyanezt a következtetést lehet levonni a mért  $F_o$  értékek  $F_{v,GL}$ -hez viszonyított  $6 \pm 2.5$  %-os csökkenéséből (4.2/a ábra). A távoli vörös fényben tartott mintákban az  $F_o$  és a  $F_{v,j}$  csökkenés mellett a fluoreszcencia intenzitása 24 h elteltével  $28 \pm 4.6$  %-kal megnőtt, ami szintén a normálás nélkül ábrázolt indukciós görbékből látható (4.2/a ábra).

### **5.1.2. Fotoszintetikus aktivitás látható és távoli vörös fényben, és a respiráció mértéke sötétben**

A Chl fluoreszcencia a PSII komplexekből ered, ezért a fluoreszcencia jel intenzitásának növekedése jelentheti azt, hogy a PSII komplexek száma megnőtt. Annak érdekében, hogy bizonyosak legyünk a PSII-k mennyiségének változásában oxigénfejlesztési rátát mértünk. Mesterséges PSII elektron akceptor (DMBQ) jelenlétében  $27 \pm 7.7$  % PSII aktivitás növekedést mértünk, amely szintén a funkcionális PSII-k felszaporodását jelzi a sejtben (4.2/a,b ábra). A 24 órás 720 nm-es megvilágítás után a fotoszintetikus elektrontranszport lánc telítő fényben mérhető oxigénfejlesztő képessége  $93 \pm 2.3 \mu\text{M O}_2 \text{ mg Chl d}^{-1} \text{ h}^{-1}$  volt. Ez  $8.8 \pm 3.2$  %-kal több, mint amit a növekedési fényben tartott kultúrában mértünk (4.2/c ábra).

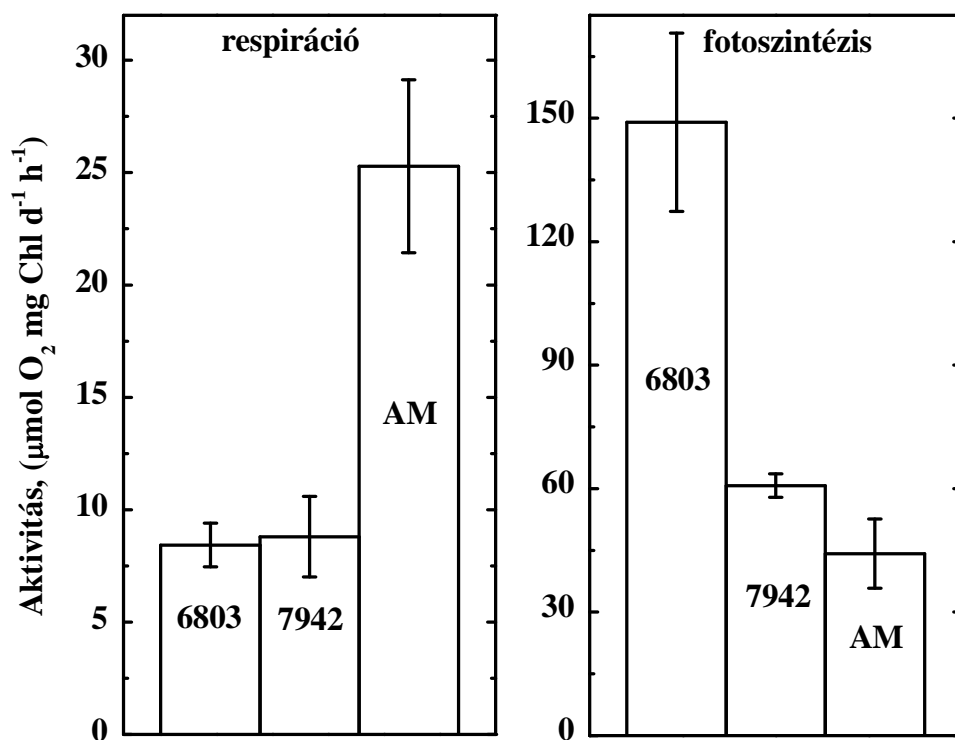


#### 4.2. ábra: A 720 nm-es távoli vörös megvilágítás hatása az *A. marina* sejtek Chl fluoreszcencia tranziensére és fotoszintetikus aktivitására

A 24 órán keresztül 720 nm-es (720, piros, üres kör), illetve növekedési fényen (NF, fekete vonal) tartott sejtek OJIP tranziense (a). Clark-elektóddal mért oxigénfejlesztés 0.5 mM DMBQ és 1 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  mesterséges elektron akceptor rendszer jelenlétében (b). Oxigén fejlesztési aktivitás hozzáadott elektron akceptor hiányában (c).

A sötétadaptált *A. marina* sejtekben a PQ pool oxidált állapota (4.1/a ábra) arra enged következtetni, hogy a respirációs oxidázok aktivitása intenzívebb, mint más cianobaktériumokban. Azért, hogy ezt a feltételezést megerősítsük, összehasonlítottuk azonos Chl koncentrációjú *A. marina*, valamint *Synechocystis* és *Synechococcus* kultúrák respirációs aktivitását. A legnagyobb eltérést az adott faj fotoszintetikus aktivitása és respirációja között a *Synechocystis* mutatta, amely a respirációjához felvett mennyiséghez képest közel 20-szor több oxigént fejlesztett. Az 1 mg Chl tartalmú *Synechocystis* és *Synechococcus* minták  $8.4 \pm 1$  illetve  $8.8 \pm 1.8 \mu\text{M}$  oxigént használtak el légzésükhöz óránként. Ezzel szemben a szintén 1 mg Chl-t tartalmazó *A. marina* minták ugyanannyi idő alatt  $25.3 \pm 3.8 \mu\text{M}$  oxigént fogyasztottak a sötétadaptálás során. A respirációs aktivitásokat az egyes fajokban összevetve az adott faj fotoszintetikus aktivitásával elmondható, hogy amíg *Synechocystis* és *Synechococcus* esetében a fotoszintetikus aktivitás meghaladja a

respirációs aktivitást, addig *A. marina* fotoszintetikus oxigénfejlesztése és respirációja közel azonos mértékű (4.3.ábra). Ez a jelenség megmagyarázza, hogy miért képes ebben a fajban, a cianobaktériumok nagy részénél megfigyeltekkel ellentétes módon, sötétben kioxidálódni a PQ pool. Ezt a kísérleti eredményt alátámasztani látszik az *A. marina* genomban található számos PQ-t oxidáló enzim, mint például a *cit bd-t*, vagy egyéb alternatív PQ oxidázt kódoló gének jelenléte (*AMI\_0483*, *AMI\_1551*, *AMI\_6029*, *AMI\_6030*) (13).

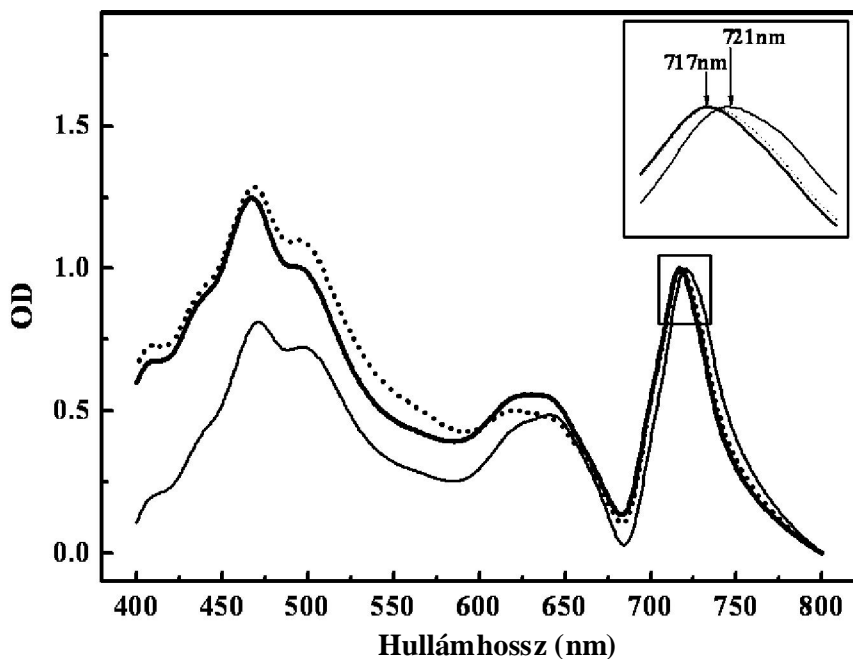


**4.3. ábra: Három különböző cianobaktérium kultúra sötétben történő oxigén felhasználásának és telítési fényen mérhető oxigénfejlesztésének a sebessége**

A méréseket Clark-típusú elektróddal végeztük az *A. marina* (AM), a *Synechococcus* (7942), és a *Synechocystis* (6803) kultúrákon 10 perces sötét adaptáció (respiráció), és 3 perces megvilágítás során (fotoszintézis).

### 5.1.3. *In vivo* abszorpciók változások limitált fényviszonyokhoz való alkalmazkodás során

Az *A. marina* széleskörű kromatikus fotoakklimációs kapacitással rendelkezik. Pigment kivonatokból *in vitro* abszorpciók mérésekkel kimutatták, hogy fényviszonyoktól függően képes változtatni *a*- és *d*-Chl arányát, valamint xantofill, karotin és PBP tartalmát (11). Az általunk vizsgált távoli vörös és alacsony intenzitású fény hatására bekövetkező akklimációs változások a sejtek *in vivo* abszorpciójában is megfigyelhetőek voltak. Ha a kultúrák 6-8 hetes nevelése során az egyedüli hasznosítható fény a 720 nm-es megvilágítás volt, akkor a sejtek az *in vivo* 645 nm-en elnyelő PBP tartalmukat fokozatosan lecsökkentették. Ezen kívül, szélsőségesen alacsony intenzitású megvilágítás ( $\sim 1 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) alatt való növesztés hatására a *d*-Chl abszorpció csúcsban 4 nm-es vörös eltolódást figyeltünk meg (4.4. ábra).



4.4. ábra: *A. marina* sejtek *in vivo* abszorpció spektruma

Az *A. marina* sejteket alacsony intenzitású ( $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , vékony, folytonos vonal) távoli vörös fényen ( $0.18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  720 nm, szaggatott vonal), illetve nevelési fényen ( $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , vastag, folytonos vonal) tartottuk két hónapon keresztül.



## 5.2. Génkifejeződési vizsgálatok

A baktériumok gyors és széleskörű alkalmazkodó képességével kapcsolatba hozható egyszerű, és így a magasabbrendű élőlényekénél jóval gyorsabb transzkripciós mechanizmusuk. A prokarióta genom nem szerveződik tömör nukleosómákba, ezért a transzkripciót végző fehérjék számára a gének könnyen hozzáférhetőek, gyorsan aktiválhatóak. Az eukariótáktól eltérően a prokariótákban a transzkripció és a transláció nincs egymástól elválasztva, egy időben és térben zajlik. Továbbá jóval kevesebb lehetőség adódik poszttranszkripciós, illetve poszttranszlációs módosításra. Következésképpen a baktériumok esetében a stressz válaszok elsősorban a különböző gének indukálásában manifesztálódnak. A prokarióta gén kifejeződést szabályzó mechanizmusok kevesebb lépcsőből állnak, ezért a génaktivációt kiváltó hatásból a vizsgált gének által kódolt fehérjék funkciójára is következtethetünk. Elmondható tehát, hogy egy prokarióta szervezet transzkripciós vizsgálatából tág körű információt nyerhetünk. A jelen dolgozatban egy rendkívül adaptívnek bizonyult cianobaktérium, az *A. marina* *psbA*, *psbD* és *psbE* homológjainak kifejeződését vizsgáltuk.

### 5.2.1. Az *A. marina* *psbA*, *psbD* és *psbE* géncsaládjai

2008-ban elérhetővé vált *A. marina* teljes genom szekvenciája (14), melynek tanulmányozása során több *psbA*, *psbD*, és *psbE* homológot találtunk. A három *psbA* gén a génkódjuk numerikus értékének sorrendjében neveztük el: *psbA1* (*AM1\_0448*), *psbA2* (*AM1\_2166*) és *psbA3* (*AM1\_2889*). A *psbA2* és *psbA3* gén azonos aminosav szekvenciájú D1 fehérjét kódol, amely a transzkript állományának mérete alapján a domináns D1 izoformának tekinthető. A *psbA1* gén által kódolt izoforma tartalmazza a közelmúltban meghatározott D1' szekvenciára jellemző konzervatív aminosav cseréket (52). A szekvencia hasonlóságok, valamint a különböző környezeti hatásokra adott transzkripciós válaszok alapján (lásd később), a két izoformát D1<sub>m</sub> és D1'-nak neveztük el. Ez az elnevezés analóg a *Synechocystis* esetében megállapított funkcionális nevezéktannal (1.1. táblázat) (9). Az *A. marina* D1' izoformája tartalmazza ugyan a D1' fehérjékre jellemző konzervatív oldallánc cseréket, azonban AS szekvenciája jelentős eltérést mutat a többi D1', valamint a konszenzus D1 szekvenciától. A nagyszámú mutáció között szerepelnek az rD1-re jellemző OEC kötésében résztvevő oldalláncok cseréi is, ezért James Murray az

*AM1\_0448* gén termékét a rD1 izoformák csoportjába sorolta (54). James Murray azonban a rD1 izoforma csoport bevezetésénél figyelmen kívül hagyta azt a fontos tényt, hogy minden D1r szekvencia tartalmazza a D1' szekvenciára konzekvensen jellemző 3 konzervatív aminosav cserét, tehát a rD1 izoforma egy mutálódott D1'-nak felel meg. Véleményünk szerint a *psbA1* anaerob indukciója, valamint a gén termékének D1'-ra jellemző konzervatív oldallánc cseréi a D1' elnevezés használatát kívánják meg. A lehetséges rD1 izoforma funkció, azaz hogy olyan izoforma lenne, amely a PSII vízbontását megakadályozza, kísérletes bizonyítást igényel.

Az eddig tanulmányozott fotoszintetikus élőlényektől eltérő módon az *A. marina* a *psbD* génjeiből is hármat tartalmaz (13), amelyek elnevezése a fentebb leírtak szerint történt: *psbD1* (*AM1\_1083*), *psbD2* (*AM1\_4084*) és *psbD3* (*AM1\_6045*). Ezek közül a *psbD1* alkot bicisztronos mRNS-t a *psbC* transzkripttel, és a *psbD2*-vel közösen kódolják az abundáns D2<sub>m</sub> izoformát. A *psbD3* gén azonban egy második, D2<sub>m</sub>-tól eltérő elsődleges szerkezetű D2 izoformát kódol. Eddig még sehol nem figyeltek meg két különböző D2 izoformát egy sejten belül. Ugyancsak egyedülálló módon az *A. marina* kettő *psbE* homológot tartalmaz genomjában, amelyek feltételezett terméke 2 különböző szekvenciával rendelkező cit b559  $\alpha$  alegység (PSII-E) (13). A *psbE1* génről átíródó  $\alpha$  alegység a PSII-E konszenzus szekvenciától jobban eltér, ezért feltételezett géntermékét PSII-E'-nak, az eltérő szekvenciájú D2 izoformát pedig szintén a D1 funkcionális nevezéktan analógiájára D2'-nak neveztük el. A *psbE*, valamint *psbA* és *psbD* gének és az általuk kódolt fehérjék elnevezését a 4.5. táblázatban foglaltuk össze.

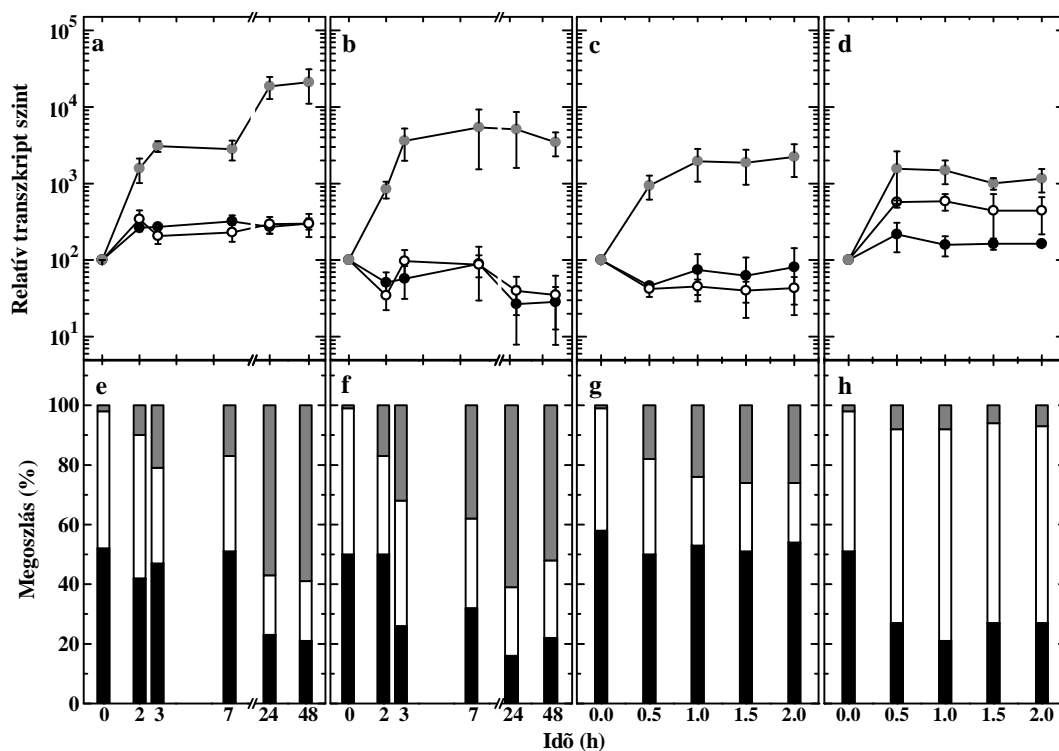
Fehérje név	Gén név	Génazonosító kód
D1 <sub>m</sub>	<i>psbA2</i>	<i>AM1_2166</i>
	<i>psbA3</i>	<i>AM1_2889</i>
D1'	<i>psbA1</i>	<i>AM1_0448</i>
D2 <sub>m</sub>	<i>psbD1</i>	<i>AM1_1083</i>
	<i>psbD2</i>	<i>AM1_4084</i>
D2'	<i>psbD3</i>	<i>AM1_6045</i>
PSII-E	<i>psbE2</i>	<i>AM1_2630</i>
PSII-E'	<i>psbE1</i>	<i>AM1_1130</i>

**4.5. táblázat:** Az *A. marina* különböző D1, D2 és PSII-E izoformái és az azokat kódoló *psbA*, *psbD* és *psbE* gének

### 5.2.2. Alacsony fényintenzitáshoz és távoli vörös fényhez való alkalmazkodás

Nevelési körülmények között a D2<sub>m</sub>-et kódoló *psbD1* és *psbD2* transzkriptek 50-50 %-ban együttesen kitöltik a teljes *psbD* mRNS állományt, amelyben a *psbD3* transzkript előfordulása elenyésző (4.5. ábra). Azonban ha lecsökkentjük a megvilágítás intenzitását, vagy ha távoli vörös fényvel világítjuk meg a kultúrát, akkor indukálódik a *psbD3* gén. 24 óra 720 nm-es megvilágítás után a *psbD1* és *psbD2* transzkriptek relatív szintje kis mértékben megemelkedett ( $3 \pm 0.7$ -szeresére), a *psbD3* mRNS szintje azonban jelentősen, ~200-szorosára növekedett, így a transzkriptek egymáshoz viszonyított %-os eloszlásában 60 % *psbD3* jelenlétet mérhettünk (4.5/a, e ábra). Egy napig tartó alacsony intenzitású megvilágítás folyamán a *psbD1* és *psbD2* gének átírásának mértéke 75 illetve 60 %-kal lecsökkent. Ebből kifolyólag annak ellenére, hogy a *psbD3* mRNS szint-emelkedés a távoli vörös fényben tapasztaltaknál kisebb mértékű volt ( $35 \pm 10$ -szeres), AF hatására is a transzkriptek egymáshoz viszonyított %-os megoszlásában 60 % *psbD3* volt jelen. A *psbD3* transzkript dominancia a *psbD* mRNS állományban a két napig tartó mérés során sem csökkent (4.5/a, b és e, f ábra). Ha a sejteket távoli vörös, illetve alacsony intenzitású fényen szaporítottuk, akkor hosszú távon (3-4 hét) is mérhető volt a D2' izoformát kódoló mRNS felhalmozódás (nem bemutatott adat).

A 4.1.1-es fejezetben leírtak alapján elmondhatjuk, hogy mind AF, mind távoli vörös fény hatására a PQ/PQH<sub>2</sub> arány megnő (4.1/b, c ábra). A PQ pool kioxidálható továbbá sötétben (4.1/a ábra), vagy ha fényben DCMU-t adunk a mintához, így meggátolva az elektronok PSII-ből PQ pool-ba jutását. Ezen körülmények között *psbD3* transzkript akkumulációt figyelhettünk meg (4.5. ábra), amely alapján feltételezhető, hogy az oxidált PQ pool pozitív regulátora a D2' izoformát kódoló gén kifejeződésének.



**4.5. ábra: A *psbD* génkifejeződés változása a PQ pool oxidációt kiváltó körülmények során**

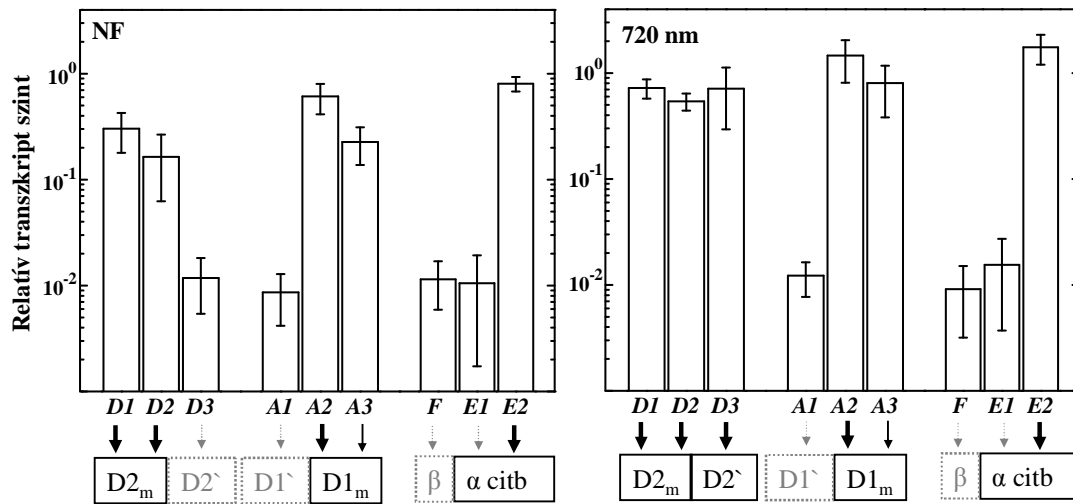
Távoli vörös fényben (a, e), alacsony fényintenzitáson (b, f), sötétben (c, g), valamint DCMU kezelés (d, h) során mért *psbD1* (fekete), *psbD2* (fehér), és *psbD3* (szürke) viszonylagos mRNS szintek. A relatív transzkript mennyiségeket normáltuk a kiindulási,  $t_0$  időpontban mért kontroll értékekhez, melyet 100-nak határoztunk meg (a, b, c, és d). Az e, f, g, és h grafikonokon a *psbD1* (fekete), *psbD2* (fehér), és *psbD3* (szürke) transzkript szintek a totál *psbD* mRNS mennyiségéhez viszonyított százalékos megoszlását mutatjuk az egyes kezelések alatt.

A PSII heterodimer másik fehérje alegységét kódoló *psbA* transzkript állományban a *psbD* mRNS-ek átrendeződéséhez hasonlóan nem tapasztaltunk. A *psbA* homológok egymáshoz viszonyított aránya a nevelési körülményeknek megfelelően alakult, és a *psbA2* transzkript mutatott domináns kifejeződést (lásd később). Alacsony fény, illetve hosszabb sötét inkubáció alatt a *psbA* transzkript állomány mérete valamelyest csökkent (nem bemutatott adat), illetve távoli vörös megvilágításra mérsékelten nőtt (4.6/b ábra).

### 5.2.3. A cit b559 alegységeinek génkifejeződése *A. marina*-ban

Az eddig vizsgált cianobaktériumoktól eltérő módon az *A. marina* nem rendelkezik a *psbEFLJ* operonnal, hanem e gének egy *psbELJ* és egy *psbEF* klaszterbe rendeződnek. Ennek következtében az *A. marina* genomjában két olyan gén is található, amelynek a feltételezett terméke a PSII-E fehérje, a cit b559  $\alpha$  alegysége (13). A génkódjuk numerikus értékének sorrendje, illetve a kódolt fehérje aminosav szekvenciája alapján az *AMI\_1130* és *AMI\_2630* géneket *psbE1* és *psbE2*-nek, terméküket pedig PSII-E és PSII-E '-nek neveztük el (4.5. táblázat). A *psbE1* gén tehát egy klaszterben található a cit b559  $\beta$  alegységét kódoló *psbF* génnel (*psbEF*), és a két gén feltételezhetően a *psbE1* gén promóterének szabályozása alatt áll, amíg a *psbE2* a PSII kis molekulatömegű L és J fehérjéivel alkot génklasztert (*psbELJ*). A *psbE2* gén relatív transzkripció aktivitása összevethető az abundáns *psbA*, illetve *psbD* génekével. Azonban a konszenzustól erősen eltérő aminosav szekvenciájú PSII-E '-ot kódoló *psbE1* gén a dolgozatban vizsgált körülmények mindegyikében mind a belső kontroll gén, mind pedig a *psbE2* génhez képest rendkívül alacsony mértékű kifejeződést mutatott (4.6. ábra). Ebből kifolyólag a *psbE1* géntől közvetlen „downstream” elhelyezkedő *psbF* génről is hasonlóképpen csekély, a *psbE2* mRNS-ek mennyiségénél mintegy 120-szor kevesebb transzkript íródik át (4.6. ábra). A transzkriptom szintjén tehát a cit b559-et alkotó  $\alpha$  és  $\beta$  alegységek mennyisége között két nagyságrendnyi különbség adódik. A  $\beta$  alegységet kódoló *psbF* génről átíródó transzkriptok mennyisége minden vizsgált körülményre változatlanul alacsony maradt (nem bemutatott adat).

Megfigyeltük továbbá, hogy a *psbE2* gén a  $D1_m$ ,  $D2_m$  és  $D2'$  indukálódik 24 órányi távoli vörös megvilágítás hatására (4.6. ábra). A 4.1.2. fejezetben leírtak alapján elmondható, hogy a hasznosítható fénytartomány 720 nm-re szűkítésére a sejtek a PSII komplexeik számának megnövelésével reagálnak (4.2. ábra), melyet a PSII központi heterodimerének abundáns izoformáit kódoló *psbA* és *psbD* gének transzkript állományának növekedése is jelez (4.6. ábra). Ezzel szemben a  $D1'$ , PSII-E'( $\alpha'$ ) és a PSII-F( $\beta$ ) alegységeket kódoló *psbA1*, *psbE1* és *psbF* transzkriptek relatív szintje nem változott. Valószínűsíthető tehát, hogy a  $D1_m$ ,  $D2_m$ , és  $D2'$  géntermékekkel együtt a *psbE2* gén terméke beépül a vörös fény alatt újonnan szintetizálódó többlet reakció centrumokba, azonban a *psbA1*, *psbE1* és *psbF* gének termékei nem.



#### 4.6. ábra: A PSII RC $D2$ , $D1$ , és cit b559( $\alpha$ - $\beta$ ) alegységeit kódoló gének

A három *psbD* ( $D1$ ,  $D2$ ,  $D3$ ), három *psbA* ( $A1$ ,  $A2$ ,  $A3$ ), egy *psbF* ( $F$ ), és kettő *psbE* ( $E1$ ,  $E2$ ) gén *rnpB* transzkript szintjéhez viszonyított kifejeződése 24 óra nevelési fény és távoli vörös megvilágítás után.

#### **5.2.4. A *psbA* és *psbD* homológok kifejeződését érintő stressz válaszok**

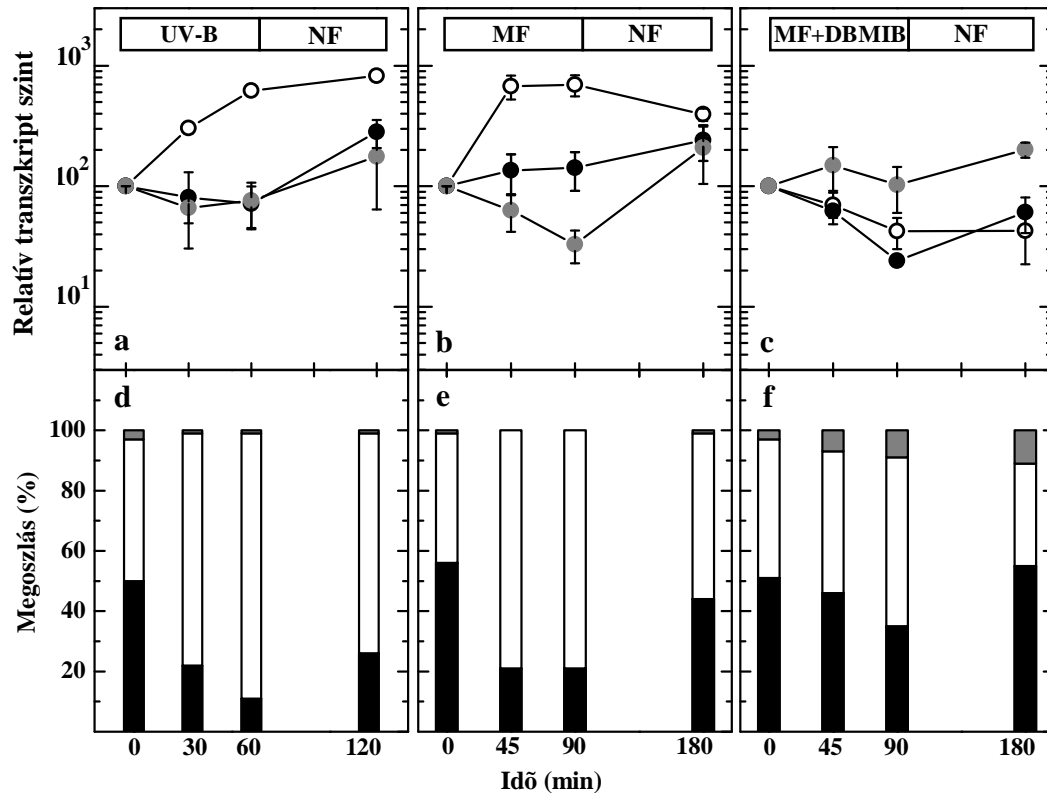
A számos, elsősorban fénystresszre jelentkező, *psbA* és *psbD* géneket érintő transzkripciós változást nagyszámú organizmusban, főként ezen gének több homológját tartalmazó cianobaktérium fajokban vizsgálták (40,41,55,131). Ezen tanulmányok alapján a *psbA* és *psbD* génduplikátumok stressz válaszban betöltött szerepe nyilvánvalóvá vált. A jelen dolgozatban az eddig tanulmányozott cianobaktériumok között egyedi akklimációs képességekkel rendelkező *A. marina psbA* és egyedi *psbD* génkészletének kifejeződését vizsgáltuk különböző stressz válaszok során.

##### **5.2.4.1. A *psbD* gének kifejeződése UV-B és magas intenzitású fénystressz hatására**

Az UV-B és MF stressz az *A. marina psbD* génkészletéből elsősorban a monocisztronos *psbD* transzkriptet kódoló *psbD2* gén kifejeződését befolyásolta. Az UV-B sugárzás hatszorosan, az MF pedig hétszeresen indukálta a *psbD2* gént. A bicisztronos *psbD1-psbC* és a *psbD3* transzkriptek szintje számottevően nem változott, enyhén emelkedett kifejeződést mutattak a stressz hatásokat követő, nevelési fényben történő helyreállítás során (4.7/a, b ábra). Következésképpen mindkét fénystressz hatására bekövetkező transzkripciós változások a *psbD2/psbD1* arány reverzibilis növekedését okozták (4.7/d, e ábra). A *psbD3* transzkript kontroll körülmények között mutatott alacsony relatív szintje e fénystresszek hatására tovább csökkent (4.7/a, b ábra), és a többi *psbD* transzkripthez viszonyított relatív mennyisége a nevelési körülmények között megfigyeltékhez hasonlóan elhanyagolható maradt (4.7/d, e ábra).

DBMIB-vel blokkolhatjuk a  $\text{citb}_6\text{f}$   $\text{Q}_0$  kötőhelyét, melynek következtében az elektronok sem a lineáris, sem a ciklikus elektrontranszport irányába nem tudnak kilépni a PQ molekulák állományából, és a redukált kinol molekulák nagy mennyiségben halmozódnak fel a pool-ban. A *psbD1* és *psbD2* gének MF-en megfigyelt indukcióját

DBMIB gátolta, és a DBMIB kezelés hatására a kezeletlen sejtekben megfigyelttel ellentétes módon e transzkriptek mennyisége MF-en lecsökkent. A *psbD3* transzkript relatív szintjében a DBMIB kezelés hatására nem jelentkezett csökkenés, továbbá a DBMIB kezeletlen sejtekben megfigyelt módon a MF stressz hatást követően enyhén indukálódott; így a totál *psbD*-hez viszonyított mennyisége valamelyest megnőtt (4.7/c, f ábra).



**4.7. ábra: A *psbD* transzkripció változása UV-B sugárzásnak kitett, valamint magas intenzitású fényvel megvilágított normál és DBMIB kezelt sejtekben**

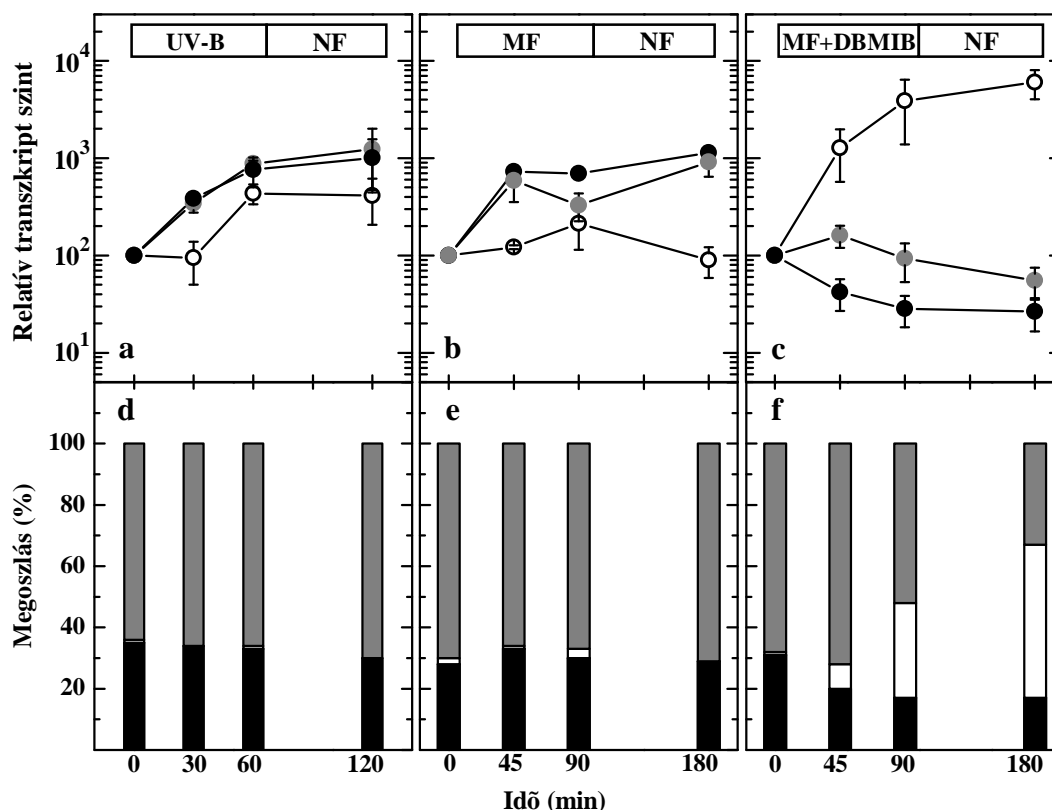
Az UV-B 60, a MF kezelés 90 percig tartott, majd a kultúrát visszahelyeztük kontroll körülmények közé, és újabb 60, illetve 90 perc múlva történt mintavétel. A relatív *psbD1* (fekete), *psbD2* (fehér), és *psbD3* (szürke) transzkript mennyiségeket normáltuk a kiindulási,  $t_0$  időpontban mért kontroll értékekhez, melyet 100-nak határoztunk meg (a, b, és c). A d, e, és f grafikonokon *psbD1* (fekete), *psbD2* (fehér), és *psbD3* (szürke) transzkript szintek össz-*psbD* mRNS mennyiségéhez viszonyított százalékos megoszlását mutatjuk az egyes kezelések alatt.



#### 5.2.4.2. A *psbA* gén kifejeződése UV-B, magas intenzitású fénystressz, elektrontranszport gátlás és oxigénhiány hatására

Kontroll körülmények között a *psbA2* és *psbA3* génekről átíródó D1<sub>m</sub> izoformát kódoló mRNS az abundáns transzkript, és a D1' izoformát kódoló *psbA1* gén kifejeződése elhanyagolható (4.8. ábra). UV-B sugárzás mindhárom, a MF stressz pedig a *psbA2* és *psbA3* gént indukálta (4.8/a, b ábra). Mindkét stressz hatására a fő, D1<sub>m</sub> izoformát kódoló transzkriptek állománya nőtt. A nagyobb transzkript állomány a fénystressz ideje alatt intenzívebb D1 szintézist tesz lehetővé, amely ezen PSII alegység gyakoribb lecserélődését szolgálhatja. Szintén megfigyelhető, hogy a kultúra helyreállása során, azaz az UV-B sugárzás és MF stressz megszűnése, és a kontroll körülmények visszaállítását követően, a *psbA* transzkript felhalmozódás folytatódott (4.8/d ábra).

A magas fényintenzitás és UV-B sugárzás hatására a három *psbA* génről átíródó transzkriptek egymáshoz viszonyított relatív mennyisége azonban számottevően nem változott, és a kontroll körülmények között megfigyeltékkel analóg módon a *psbA2* és *psbA3* génről átíródó transzkriptek ~70-30 %-ban töltötték ki a *psbA* transzkript állományt. (4.8/d, e ábra). Ezzel szemben a fotoszintetikus elektrontranszport gátlása DBMIB kezeléssel a *psbD* transzkripciónál (4.7/c ábra) megfigyeltékhez hasonló módon a *psbA* transzkriptek esetén is felülírja a fénystressz génkifejeződésre gyakorolt hatását. DBMIB jelenlétében a *psbA2* és *psbA3* gén kifejeződése gátolt, ugyanakkor az eltérő szekvenciát kódoló *psbA1* mRNS relatív szintje 60-szorosan megemelkedett. A *psbA1* transzkript akkumuláció három óra elteltével 50 %-ot ért el a totál *psbA* mRNS állományban (4.8/c és f ábra).

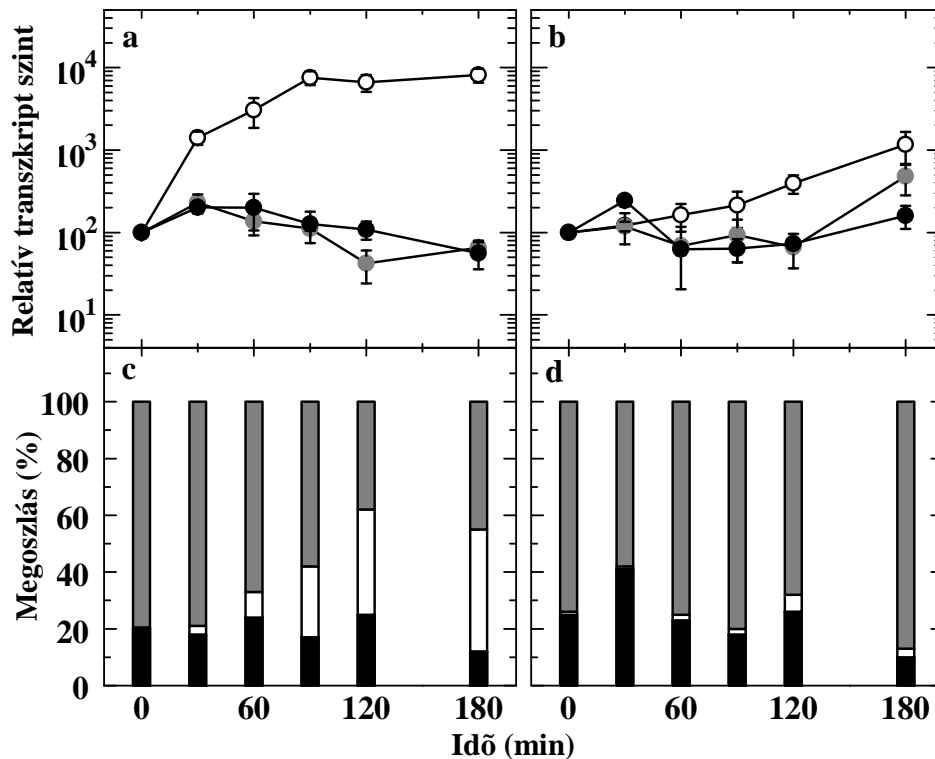


**4.8. ábra: A *psbA* transzkripció változása UV-B sugárzásnak kitett, valamint magas intenzitású fényvel megvilágított normál és DBMIB kezelt sejtekben**

Az UV-B 60, a MF kezelés 90 percig tartott, majd a kultúrát visszahelyeztük kontroll körülmények közé és újabb 60, illetve 90 perc múlva történt mintavétel. A relatív *psbA1* (fehér), *psbA2* (szürke), és *psbA3* (fekete) transzkript mennyiségeket normáltuk a kiindulási,  $t_0$  időpontban mért kontroll értékekhez, melyet 100-nak határoztunk meg (a, b, és c). A d, e, és f grafikonokon *psbA1* (fehér), *psbA2* (szürke), és *psbA3* (fekete) transzkript szintek a totál *psbA* mRNS mennyiségéhez viszonyított százalékos megoszlását mutatjuk az egyes kezelések alatt.

A DBMIB hatás nem fényintenzitás függő, nevelési fényben is hasonlóképpen aktiválta a *psbA1*-et, miközben inaktiválta a *psbA2* és *psbA3* géneket, mintegy 40 % *psbA1* totál *psbA* mRNS pool-hoz viszonyított eloszlást idézve elő (4.9/a, c ábra). A *psbA1* gén termékének származtatott aminosav szekvenciája (lásd később) tartalmazza azt a három konzervatív aminosav cserét, amely más D1 izoformában nem, viszont az összes eddig leírt D1' szekvenciában előfordul (52). Az eddig tanulmányozott cianobakteriális D1'

izoformákról kimutatták, hogy kontroll körülmények között ugyan nem fejeződnek ki, azonban anoxia hatására génjeik indukálódnak (51-53). A *psbA1* gén oxigénhiányos környezetben lassabban és kisebb mértékben aktiválódott, mint DBMIB hatására. Megfigyeltük továbbá, hogy három óra anaerob kezelés után az abundáns D1<sub>m</sub> izoformát kódoló *psbA2* mRNS relatív szintje is valamelyest megemelkedett. Következésképpen a D1' és D1<sub>m</sub> izoformákat kódoló transzkriptek aránya a kontroll körülményekhez képest számottevően nem változott (4.9/b és d ábra).



**4.9. ábra: A *psbA* transzkripció változása oxigénszegény környezetben valamint nevelési fényen alkalmazott DBMIB hatására**

szegény környezetben valamint nevelési fényen alkalmazott A  $t_0$  időpontban mért kontroll értékekhez viszonyított (a és b) *psbA1* (fehér), *psbA2* (fekete), és *psbA3* (szürke) transzkript szintek változása oxigénhiány (b,d) és DBMIB (a, c) hatására. A c és d ábra mutatja a *psbA* transzkriptek egymáshoz viszonyított %-os megoszlását.

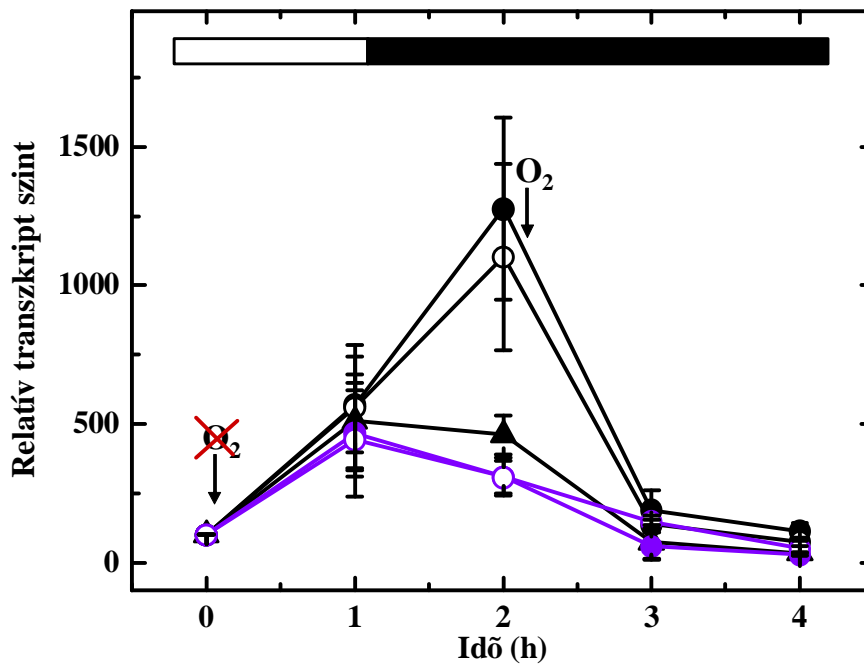
### 5.2.5. A szolubilis hidrogenáz transzkripciójának vizsgálata

Az oxigénfejlesztő fotoszintézist folytató cianobaktériumok nagy része fenntart olyan enzimeket, amelyek csak oxigén hiányában működőképesek. Ezek az enzimek általában az oxigénfejlesztő PSII komplextől térben elkülönülten, a molekuláris nitrogén megkötésére specializálódott heterocisztákban találhatóak. Számos faj azonban nem rendelkezik heterocisztákkal, tehát az oxigénfejlesztés és az anaerob környezet igénye ugyanabban a sejtben merül fel. Hogy milyen szabályozás révén éri el a sejt, hogy a két ellentétes enzimműködés megférjen egymás mellett továbbra is kérdéses. A PSII komplexek oxigénfejlesztésében kiemelten fontos D1 fehérje D1' izoformájának anaerob indukciója a PSII oxigénhiányos környezetben történő specifikus szabályozására utal. A jelen dolgozatban két egysejtes nem heterocisztás, anaerob indukciót mutató D1' izoformával rendelkező cianobaktérium (*A. marina* és *Synechocystis*) oxigén szenzitív hidrogenáz enzimének transzkripció szabályozását vizsgáltuk.

#### 5.2.5.1. A *hox* gének kifejeződése *Synechocystis*-ben

A cianobakteriális szolubilis hidrogenáz működését talán a legérősebben a *Synechocystis* törzsben jellemezték (92,99,100,132,133). Ennek ellenére az enzim strukturális génjeinek kifejeződéséről nem áll rendelkezésre elegendő információ. Ezért ebben a fajban, mint ismert modell rendszerben vizsgáltuk a *hox* gének transzkripció szabályozását. A Hox enzim oxigén hatására reverzibilisen, és egyes fajokban akár irreverzibilisen is inaktíválódhat (90). Kísérleti adatok arra utalnak, hogy *Synechocystis*-ben az inaktív enzim alegységei aerob körülmények között is jelen vannak a citoplazmában (92). A *hox* gének kifejeződése tehát folyamatosnak vélhető. Ha a tápoldat oldott oxigén koncentrációját 1  $\mu$ M körüli értékre csökkentettük, akkor a *hox* gének kb. ötszörös indukcióját figyelhettük meg (4.10., 4.11., 4.13. ábra). Ha ugyanilyen oxigén koncentrációjú tápoldatban tartott sejteket sötétbe helyeztünk, akkor az operonban található első két gén (*hoxE* és *hoxF*) tovább indukálódott. Ezzel szemben a harmadik, szintén diaforáz alegységet kódoló *hoxU*, valamint a hidrogenáz alegység génjei (*hoxY* és *hoxH*) alacsonyabb relatív transzkripció szintet mutattak a fényben mért anaerob indukcióhoz képest (4.10., 4.11. ábra). Ha a sötét anaerob kezelést levegő kultúrán keresztüli átbuborékolásával megszüntettük, akkor mind az öt *hox* transzkript mennyisége együttesen

lecsökkent (4.10. ábra). Megállapítható tehát, hogy az oxigénhiányos környezetben jelentkező *hox* indukció reverzibilis, és oxigén hatására megszűnik. Az anaerob indukció eltérő mintázatot mutat fényben illetve sötétben, ami arra utal, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport hatást gyakorol a hidrogenáz transzkripciójára.

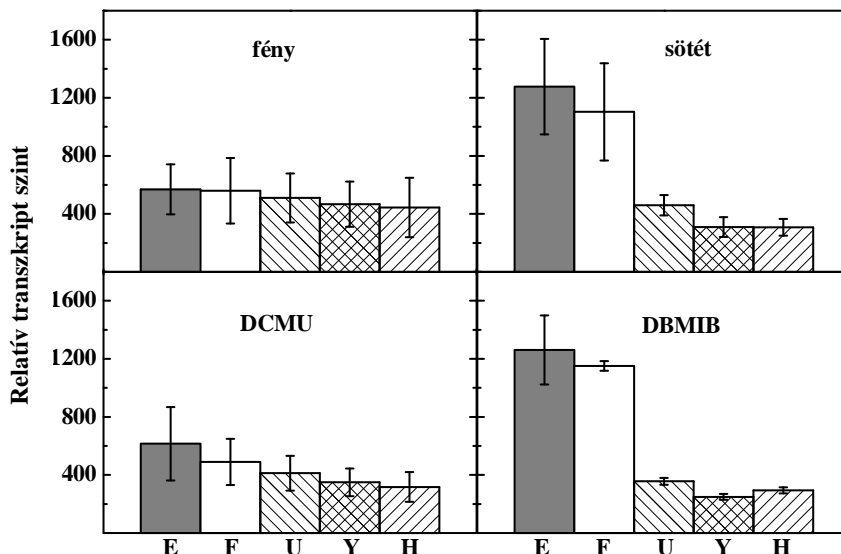


**4.10. ábra:** Az oxigénhiány és a sötét hatása a *Synechocystis hox* gének kifejeződésére

A fehér és fekete sávok a fény illetve sötét állapotot tükrözik. Szimbólumok: *hoxE* (teli kör), *hoxF* (üres kör), *hoxU* (háromszög), *hoxY* (lila teli kör), és *hoxH* (lila üres kör).

Azért, hogy bizonyítsuk, hogy a fotoszintetikus elektrontranszporton keresztül történő szabályozás révén látunk eltérő anaerob indukciót fényben illetve sötétben, elektrontranszport gátlókat használtunk az anaerob kezelés során. Ha csak a lineáris elektrontranszportot gátoltuk DCMU kezeléssel, akkor az anaerob génkifejeződés a fényben tapasztalt indukcióhoz hasonlóan alakult (4.11. ábra). Az anaerob kezelés során DBMIB hozzáadásával legátolt lineáris és ciklikus elektrontranszport azonban a sötét-anaerob körülménnyel megegyező hatásnak bizonyult; azaz a DBMIB fényben kiváltotta a *hoxE* és *hoxF* gének sötétben tapasztalt magasabb indukcióját (4.11. ábra). Az anaerob-

sötét körülmények között tapasztalt, a többi *hox* transzkript mennyiségétől eltérő *hoxE* és *hoxF* transzkript kvantitás a *hox* operonon érvényesülő addicionális, fotoszintetikus elektrontranszport-függő szabályozási mechanizmusra utal.



**4.11. ábra: A fény, a sötét, és a fényben alkalmazott DCMU, és DBMIB okozta különbségek a *Synechocystis hox* gének anaerob indukciójában**

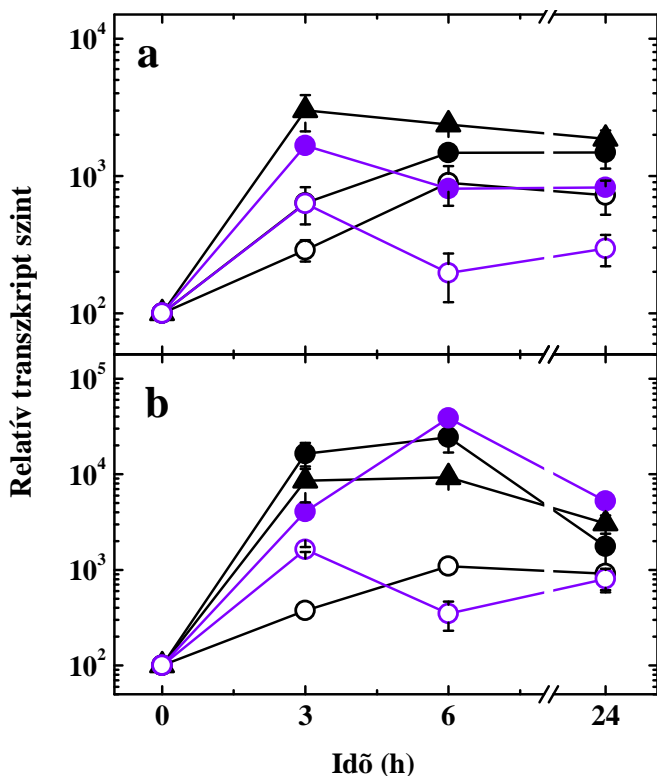
A *hoxE* (szürke), *hoxF* (fehér), *hoxU* (balra csíkos), *hoxY* (négyzetrácsos) és *hoxH* (jobbra csíkos) gének relatív transzkript szintjét egy órán keresztül  $\sim 1 \mu\text{M}$  oldott oxigén tartalmú tápoldatban tartott sejtekben mértük sötétben és fényen,  $10 \mu\text{M}$  DCMU, vagy  $20 \mu\text{M}$  DBMIB elektrontranszport gátlók jelenlétében, illetve hiányában.

**5.2.5.2. Az *A. marina hox* génjeinek kifejeződése távoli vörös és alacsony intenzitású fényhez való alkalmazkodás során**

Az *A. marina*-ban foto-hidrogén fejlődést mutattak ki (111), tehát az *A. marina* Hox hidrogenáza várhatóan a fotoszintetikus elektrontranszporttal kapcsolatosan működik. A *hox* gének kifejeződése távoli vörös fényhez, vagy extrém alacsony fényintenzitásokhoz történő alkalmazkodás során három óra alatt jelentősen megnövekedett, és az intenzív transzkripció 24 óra elteltével is mérhető volt. A különböző alegységeket kódoló gének AF, és távoli vörös fény hatására eltérő mértékben indukálódtak: a legmagasabb

viszonylagos transzkript szint emelkedést (100- és 30-szoros AF, illetve 720 nm-es fényen) a kis diaforáz alegység génje, a *hoxU* mutatta. Ennél valamivel alacsonyabb mértékben, 15-, illetve 40-szeresen halmozódott fel a kis hidrogenáz alegység transzkriptje (*hoxY*). A legalacsonyabb relatív transzkript szintet (háromszoros indukció) mindkét kezelés alkalmával a nagy diaforáz alegység (*hoxF*) génje adta (4.12. ábra).

Az *A. marina*-nak távoli vörös, illetve alacsony intenzitású fényhez történő alkalmazkodása során ellensúlyoznia kell a fokozott PQ pool-t oxidáló hatásokat (lásd 4.1.1. fejezet). A megemelkedett Hox kifejeződés azt jelzi, hogy ez az enzim komplex is részt vehet közvetett, vagy közvetlen módon az akklimációs folyamatban, azáltal, hogy elektronokat juttat a lineáris elektrontranszport kioxidálódott komponenseire, így elősegítve az elektrontranszport egyenletesebb lefolyását.

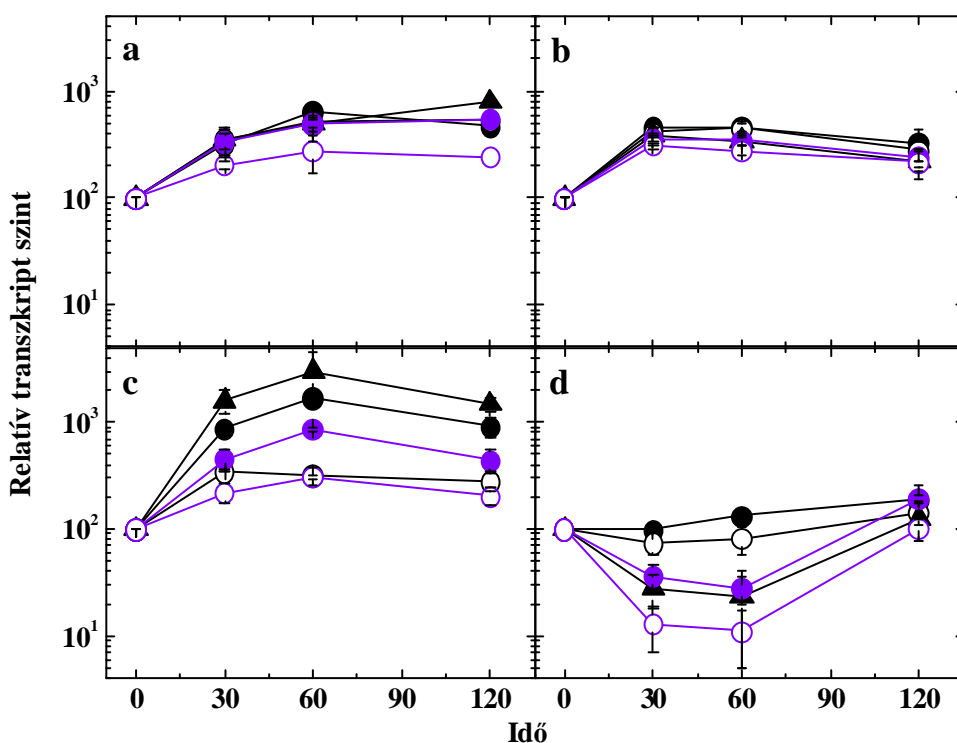


**4.12. ábra: Az *A. marina* *hox* génkifejeződésének változása eltérő fényviszonyokhoz való adaptáció során**

A *hoxE* (fekete teli kör), *hoxF* (fekete üres kör), *hoxU* (szürke háromszög), *hoxY* (lila teli kör), *hoxH* (lila üres kör) viszonylagos transzkript szintjének változását 720 nm hullámhosszú távoli vörös (a), valamint alacsony intenzitású (1 µE) látható fényvel megvilágított kultúrákban (b) mértük.

### 5.2.5.3. A *hox* gének kifejeződése az *A. marina*-ban, a *Synechocystis*-ben és a *Synechococcus*-ban

A *Synechocystis* hidrogenáz esetében bebizonyosodott, hogy a két alapvető *hox* transzkripciót befolyásoló környezeti faktor az oxigén-, valamint a fénymegvonás (4.10. ábra). A továbbiakban a két törzsben található analóg elrendeződést mutató hidrogenáz gének oxigén- és fényfüggő szabályozását hasonlítjuk össze. Anaerob környezetben mindkét fajban a *hox* gének 4-5-szörös aktivációját tapasztaltuk (4.13/a, b ábra). Sötétben azonban a *Synechocystis* és az *A. marina* *hox* génjeinek kifejeződése ellentétesen alakult. *Synechocystis* esetében a *hox* gének sötét-aerob körülmények között nem indukálódtak, ellenkezőleg, a *hoxU*, *hoxY* és a *hoxH* gének kifejeződése a fényben mérhető aerob szinthez képest 4-5-ször kisebb mértékű volt sötétben (4.13/d ábra).



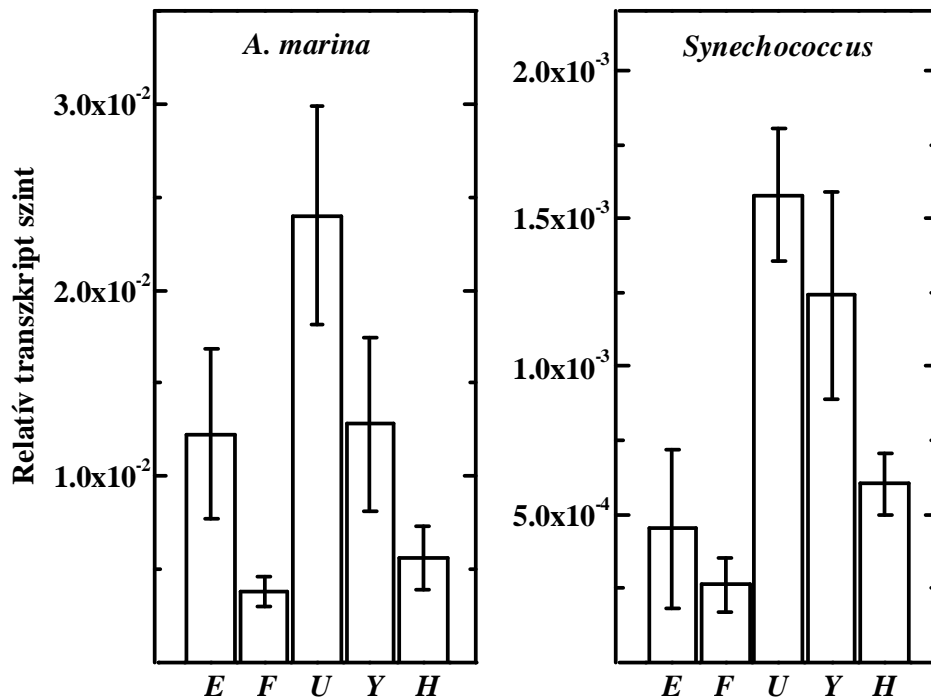
4.13. ábra: A sötét és az oxigénhiány hatása az *A. marina* és a *Synechocystis* *hox* gének kifejeződésére

A *hoxE* (fekete teli kör), *hoxF* (fekete üres kör), *hoxU* (szürke háromszög), *hoxY* (lila teli kör), és *hoxH* (lila üres kör) transzkriptek relatív szintjét oxigén hiányos környezetben (a, b) illetve sötétben, oxigén jelenlétében (c,d) tartott *A. marina* (a, c) és *Synechocystis* (b, d) kultúrákból izolált RNS mintákból határoztuk meg.



Ezzel szemben az *A. marina* hidrogenázának génjei sötétben jelentős indukciót mutattak az oxigén jelenlététől függetlenül. Az eltérő fényviszonyokhoz való adaptáció során megfigyeltekkel analóg módon a *hox* klaszteren belüli gének sötétben megfigyelt indukciója különböző mértékű: amíg a nagy diaforáz, illetve a nagy hidrogenáz alegység génjei (*hoxF* és *hoxH*) háromszorosan indukálódtak, addig a kis diaforáz alegységet kódoló *hoxU* gén meghaladta a 30-szoros indukciót (4.13/c ábra).

Az *A. marina* *hox* klaszterén belüli gének kifejeződése eltérő mértékű. A dolgozatban vizsgált összes körülmény során a *hoxU* génről íródott át a legnagyobb mennyiségű mRNS. A *hox* transzkriptek viszonylagos eloszlása a *Synechococcus* *hox* gének kifejeződési mintázatával mutat analógiát (4.14. ábra). A *Synechococcus* *hoxEF* és *hoxUYH* operonok kifejeződésének részletes tanulmányozása során a mi méréseinkhez hasonló, *hoxE*-hez viszonyítottnan ~négyeszeres *hoxU* transzkripció aktivitást állapítottak meg (97).



**4.14. ábra: Az *A. marina* és a *Synechococcus* *hox* génjeinek viszonylagos kifejeződése**

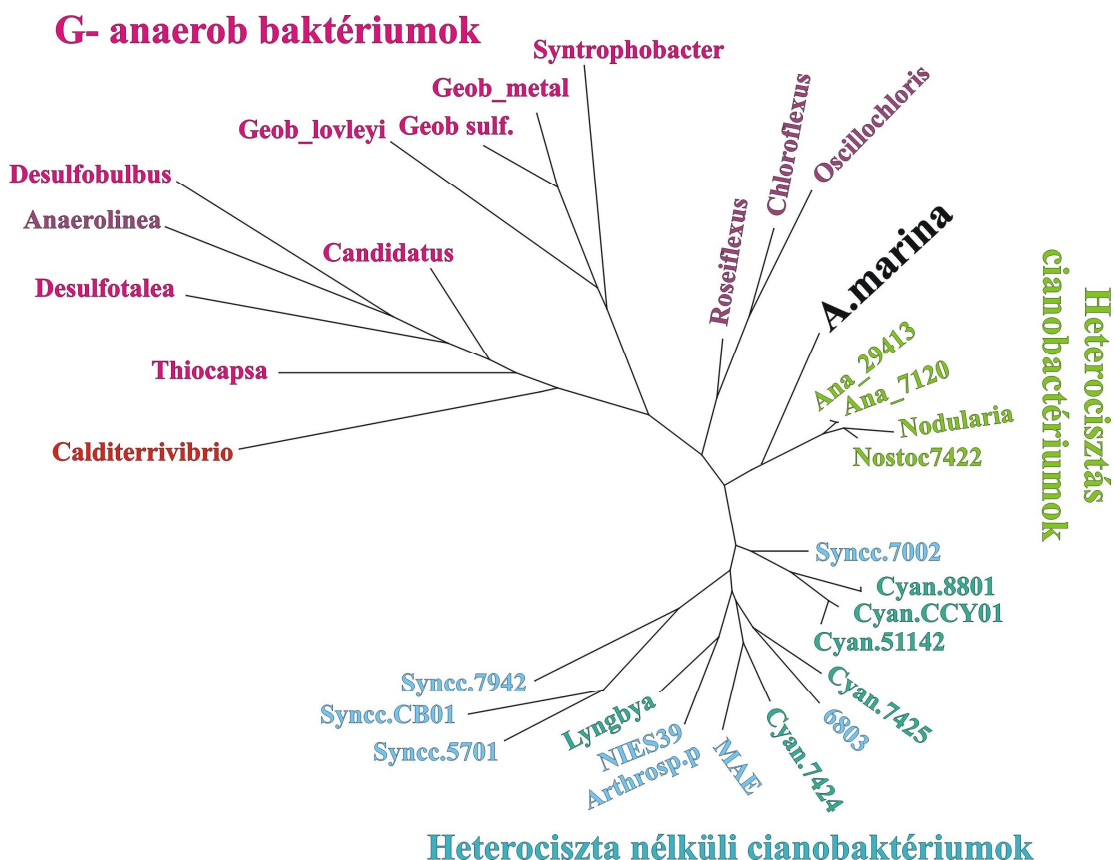
A nevelési körülmények során mért *hox* transzkript szinteket a belső kontroll gén (*rnpB*) transzkript szintjéhez viszonyítottan mutatjuk be.

#### 5.2.5.4. A Hox hidrogenáz kis diaforáz alegységének filogenetikai analízise

A kétirányú hidrogenáz enzimkinetikai jellemzői alapján feltételezhető, hogy a Hox enzim általában a  $H_2$  felvétel irányába működik(134). Ez alapján feltételezhető, hogy a nitrogénfixáló fajokban elsősorban hidrogén felvevő, „uptake” hidrogenázként funkcionál, azaz a nitrogénáz által fejlesztett melléktermék hidrogént veszi fel és forgatja vissza elektron és proton formájában az elektrontranszportba. Az *A. marina* Hox enzime a nitrogénfixáló heterocisztás cianobaktériumok hidrogenázával alkot monofiletikus csoportot. Az *A. marina* nem rendelkezik nitrogénázzal, genomjában azonban fellelhetőek molibdén-függő nitrogénáz gének maradványai (*AMI\_2462*, *AMI\_3585*, és *AMI\_A0295*), valamint a nitrogénáz enzim szintézisében szerepet játszó *nifU* „chaperon” fehérje génje. Figyelemre méltó, hogy az *AMI\_4010* gén a szekvencia hasonlóság szerint egy heterociszta differenciálódásért felelős fehérjét kódolhat (13). Feltételezhető tehát, hogy az *A. marina* egy heterocisztás cianobaktérium leszármazottja. Annak ellenére, hogy evolúciós fejlődése során az *A. marina* elvesztette nitrogénfixáló képességét, a Hox hidrogenázát megtartotta, ami arra utal, hogy a Hox enzim funkciója valószínűleg a heterocisztás fajokban sem feltétlenül függ össze a nitrogénáz működésével. Az, hogy a *hox* gének a heterocisztás fajok vegetatív sejtjében (ahol nitrogénfixálás nem történik) is kifejeződnek (135,136) szintén azt mutatja, hogy a Hox enzim, vagy egyes alegységei a nitrogénfixálással kapcsolt  $H_2$  felvételtől elkülönülő funkcióval is rendelkeznek.

A filogenetikai fa topológiája alapján három fő csoport különül el: (i) Gram negatív anaerob baktériumok, (ii) heterocisztás, és (iii) heterociszta nélküli cianobaktériumok. A filogramon megfigyelhető csoportosulás alapján feltételezhetjük, hogy a Hox enzim szerkezetének és funkciójának evolúciója szempontjából a heterociszták megléte a nitrogénfixálás képességénél nagyobb jelentőséggel bírt. A Gram negatív anaerob baktériumokban a Hox hidrogenáz egy állandóan erősen redukáló környezetben működik. Ezzel szemben a heterocisztákkal nem rendelkező cianobakteriális sejtekben az oxidáló folyamatok vannak túlsúlyban. A heterocisztás cianobaktériumokban attól függően, hogy az enzim a heterocisztában, vagy a vegetatív sejtben fejeződik ki, mind oxidáló (vegetatív), mind redukáló (heterociszta) környezetben működhet.

A HoxU alegység aminosav szekvenciájával végzett filogenetikai analízis alapján létrejött funkcionális és kevésbé taxonómiai csoportosulásokra tehát egy lehetséges magyarázat a hidrogenáz enzim redukáló, oxidáló, redukáló/oxidáló közege, amely feltételezhetően alapvető működésbeli különbségeket eredményez.



**4.15. ábra: A kétirányú hidrogenáz HoxU alegységének aminosav szekvenciája alapján felállított filogram**

A szekvencia illesztéshez felhasznált HoxU aminosav szekvenciák adatbázis azonosító kódját, valamint a törzsek listáját a 3.3 táblázat tartalmazza. Színkódok: piros: Deferribacteraceae, rózsaszín: Proteobacteria, lila: Chloroflexi / Fonelas-Anaerob-Fotoszintetizáló Baktériumok törzse (FAPB), zöld: heterocisztás cianobaktériumok, cián: egysejtes nitrogénfixáló cianobaktériumok, égbék: egysejtes N<sub>2</sub>-fixációra nem képes cianobaktériumok. Az egyes ágak hossza a mutációk számával arányos. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a „bootstrap” értékeket nem tüntetjük fel.

## 6. Az eredmények megvitatása

Az *A. marina* megnövekedett genom mérete, nagyszámú plazmidja azt jelzi, hogy ez a cianobaktérium egy evolúciós szempontból aktívan változó organizmust képvisel. Ezt az állítást erősíti egy másik *Acaryochloris* nemzetségbe tartozó faj, az *Acaryochloris* CCMEE 5410 részlegesen szekvenált genomján elvégzett duplikációs analízis (15). Az *Acaryochloris* CCMEE 5410 genom projekttel kapcsolatban publikussá tett információból kiderül, hogy e másik *Acaryochloris* faj genomjában is megtalálható számos *psbA*, három *psbD* valamint két *psbE* génduplikátum (116). A génduplikációs frekvencia baktériumok esetében ( $10^{-3}$ /gén/generáció) az eukariótáknál becsült duplikációs gyakorisággal összevethető (137,138), azonban amíg az eukarióta genomokban hemzsegnek a régi és újkéletű génduplikátumok (139), addig a baktériumoknál általában csak néhány közelmúltban történt duplikáció fordul elő genomként (140). Ez azzal magyarázható, hogy a prokarióta genomból a génduplikátumok rendkívül gyorsan kiszelektálódnak. Csak azok a paralógok maradhatnak fent, amelyek valamilyen szelekciós előnyt jelentenek az egyed számára, például azáltal, hogy a fehérje szintézist kiszolgáló transzkript állomány több génkópiáról íródhat át (16,17). Az, hogy a jelen dolgozatban vizsgált *psbA*, *psbD*, és *psbE* homológok az *A. marina* genomban, továbbá az eddig ismert genomú két *Acaryochloris* faj különválásánál is fennmaradtak, azt bizonyítja, hogy a *psbA*, *psbD* valamint *psbE* duplikátumok szelekciós előnyt jelentenek.

Az *A. marina* egy rendkívül adaptív cianobaktérium, amely drasztikusan eltérő hullámhosszú és intenzitású fényviszonyokhoz képes alkalmazkodni (11,12). Nagyméretű genomját szintén kapcsolatba hozták nagymértékű adaptációs képességével (14). Feltételezésünk szerint az általunk vizsgált PSII alegységeket kódoló homológok is szerepet játszanak az *A. marina* fotoszintetikus akklimációjában. A jelen dolgozatban azt vizsgáltuk, hogy milyen környezeti feltételek között aktiválódnak az *A. marina* genomban található *psbA*, *psbD* valamint *psbE* génduplikátumok, és ebből kifolyólag milyen feltételezett szelekciós előnyt jelenthetnek az egyed számára.

## 6.1. A fotoakklimáció fiziológiai megnyilvánulásai

A PQ állományban található kinon/kinol molekulák arányának változásával számos fotoakklimációs folyamatot nyomon követhetünk. Megfigyeltük, hogy az eddig tanulmányozott cianobaktériumok nagy részével ellentétes módon az *A. marina* esetében a sötét PQ oxidációt váltott ki (4.1. ábra), amely a sötétben jelentkező erős respirációs oxidáz aktivitással magyarázható (4.3. ábra). Az *A. marina* intenzív respirációs aktivitása a genomjában található számos addicionális oxidáz génnel (*AMI\_0483*, *AMI\_1551*, *AMI\_6029*, *AMI\_6030*) kapcsolatba hozható (13).

Távoli vörös és alacsony intenzitású látható fényben szintén PQ oxidációt figyelhetünk meg. Feltételezhetően azért, mert ilyen körülmények között a PQ állományt oxidáló hatások (PSI és oxidázok) erőteljesebbek, mint a PSII-ből származó elektrontranszport. A távoli vörös fényben a PQ oxidáció, és az emelkedő PSII mennyiség azt jelzi, hogy a 720 nm-es megvilágítás a PSI komplexek által jobban hasznosítható, így ebben a fénytartományban PSI irányába tolódik el a RC gerjesztés. A RC-ok gerjesztésében bekövetkező aránytalanságot ilyen körülmények között a PSII-k számának megnövelése ellensúlyozza (4.2. ábra). Mindkét RC fő pigmentje a 720 nm környékén abszorbeáló *d*-Chl, ezért ebben a fénytartományban nem várnánk hullámhossz preferenciát. A 720 nm-en előnyt élvező PSI gerjesztés csak a külső antennák, azaz a PBP közti különbséggel magyarázható. A 645 nm *in vivo* abszorpciót mutató PBP antennák fizikai kapcsolata a PSII centrumokkal bizonyítást nyert (87). Annak ellenére, hogy *in vivo* akciós spektrum PBP-től PSI-re irányuló energia transzfert jelez (141,142), a PBP-PSI szuperkomplex létezését ez idáig nem mutatták ki. A hosszabb ideig (néhány hónap) 720 nm-es fényvel világított sejtek lecsökkentették PBP/*d*-Chl arányukat (4.4. ábra), mivel a 645 nm-en abszorbeáló antennák a fénybegyűjtésben használhatatlanná váltak.

Eredményeink tehát a PBP antennák PSII centrumokkal alkotott fizikai kapcsolatát támasztják alá. Ez a fizikai kapcsolat 720 nm-es fényben hátrányt jelent a PSII centrumok számára, így a gerjesztési energia egyenlőtlenül oszlik meg a PSI és PSII centrumok között, amelyet a sejtek PSII komplexek számának növelésével, és a PBP antennák leredukálásával egyensúlyoznak ki.

Alacsony fényen növesztett kultúrákban a *d*-Chl *in vivo* abszorpciójában mintegy 4 nm-es vörös eltolódást figyeltük meg (4.4. ábra). A fehérje környezet hatására a Chl molekulák abszorpciójában jelentkező vörös eltolódás egy ismert jelenség. Az alacsony

intenzitású fényen növesztett kultúra *in vivo* abszorpciós spektrumában mutatkozó változás feltételezhetően egy *d*-Chl tartalmú Pcb antennákat érintő fehérje környezettel összefüggésben álló kromatikus átrendeződés jele. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy a nem kielégítő fénymennyiséghez való alkalmazkodáshoz az *A. marina* a *d*-Chl tartalmú antennáit használja. A fő pigment vörös eltolódása továbbá azt jelzi, hogy az *A. marina* *d*-Chl fehérje-környezetének változtatásával még távolabbi vörös fény elnyelésére lehet képes.

## 6.2. Az eltérő fényviszonyokhoz való adaptáció megnyilvánulása a PSII RC-t kódoló gének kifejeződésében

Az *A. marina* egyedülálló módon két különböző D2 izoformával rendelkezik, melyeket három *psbD* gén kódol. A *psbD1* és *psbD2* gén ugyanazt az izoformát, a sejtben nagy mennyiségben előforduló D2<sub>m</sub>-et kódolja. A *psbD1* egy átíróadási egységet képez CP43-mal, amíg *psbD2*-ről egy monocisztronos *psbD* transzkript íródik át. Magas intenzitású megvilágítás, vagy UV-B sugárzás hatására a monocisztronos *psbD* gén viszonylagos kifejeződése megnő (4.7/a, d és b, e ábra).

Az *A. marina* az abundáns D2<sub>m</sub> izoforma mellett egy másik, addicionális *psbD* gén (*psbD3*) által kódolt izoformát is tartalmaz; melyet eltérő aminosav szekvenciájából kifolyólag D2'-nak neveztünk el. A *psbD3* gén NF körülmények közti kifejeződése a másik kettő *psbD* génhez képest elhanyagolható mértékű, azonban 720 nm-es megvilágítás, AF, sötét, valamint DCMU kezelés hatására aktiválódott (4.5. ábra). A DCMU molekula a PSII Q<sub>B</sub> zsebébe kötődik, meggátolva az elektronok kinon molekulákra kerülését. Ha a kezelést fényben alkalmazzuk, akkor a PSI felé menő elektrontranszport kioxidálja a PQ állományt, ahová az elektronok a PSII felől nem pótlódhatnak. Hasonlóképpen, de eltérő okokból eredően (lásd fentebb) az AF, a 720 nm fény, és a sötét is PQ oxidációhoz vezet (4.1. ábra). A *psbD3* génaktiváció tehát PQ oxidációjával párhuzamosan történik, amely alapján közvetett, vagy közvetlen PQ-on keresztülmenő transzkripció szabályozás feltételezhető.

A hagyományos neoncsövekkel előállított 5-10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  növesztési fénynél (NF) a kezelések során alkalmazott AF, illetve távoli vörös fény az *A. marina* természetes élőhelyén található fényviszonyokhoz közelebb áll (76,77). A D2' erőteljes kifejeződése a hosszabb ideig (hetekig) AF és 720 nm fényen tartott, és ott továbboltott kultúrákban is







#### 6.4. Az *A. marina* *psbA* géncsaládja

A PSII centrumokban gyakran lecserélődő D1 fehérjét kódoló gének duplikátumai kétségtelenül szelekciós előnyt jelentenek, így a cianobakteriális genomok általában több *psbA* gént tartalmaznak. Az *A. marina* három *psbA* homológgal rendelkezik, amelyek közül kettő, a *psbA2*, és a *psbA3*, a sejten nagy mennyiségben előforduló D1<sub>m</sub>-et kontroll körülmények között ~70-30 %-ban kódolja. A *psbA2*, és a *psbA3* tehát azonos elsődleges szerkezetű izoformát kódol, melynek aminosav szekvenciájától a *psbA1* gén terméke azonban jelentősen eltér.

MF és UV-B stressz elleni védekező mechanizmus során a D1 fehérje lecserélődésének gyakorisága megnő, amely egy megemelkedett, D1<sub>m</sub> izoformát kódoló *psbA2* és *psbA3* mRNS állományt igénylő intenzívebb D1 szintézissel jár együtt. A *psbA1* transzkript relatív mennyisége a kontroll körülményekhez hasonlóan a stressz körülmények alatt is elhanyagolható maradt. Azonban ha a fotoszintetikus elektrontranszportot DBMIB-vel gátoljuk a cit b<sub>6</sub>f Q<sub>O</sub> oldalán, a *psbA1* gén nagymértékben aktiválódott, amellyel párhuzamosan a *psbA2* és *psbA3* transzkriptek mennyisége lecsökkent. Ebből kifolyólag a *psbA* transzkriptek egymáshoz viszonyított aránya átrendeződött, és a *psbA* mRNS állományban a *psbA1* transzkript a D1<sub>m</sub> izoformát kódoló transzkriptekkel szemben 40-50 %-ban felhalmozódott. A *psbA1* gén transzkripció aktivitása UV-B és anoxia hatására is valamelyest megemelkedett, aktivációja azonban jóval kisebb mértékű, illetve anoxia esetében lassabb is annál, amit DBMIB jelenlétében megfigyelhettünk, és a totál *psbA* mRNS állományban a *psbA1* relatív megoszlása elhanyagolható maradt.

A PsbA1 tartalmazza azt a három konzervatív aminosav cserét (Gly80Ala, Phe158Leu, Thr286Ala), amely alapján a D1' izoformák *in silico* megkülönböztethetők a többi D1 izoformától (52) (5.3. ábra). Követve az eddig vizsgált cianobakteriális *psbA* kifejeződési mintázat alapján felállított funkcionális nevezéktant: a három tipizáló aminosav csere megléte, a kontroll körülmények között megfigyelt alacsony kifejeződése, valamint anaerob indukciója az *A. marina* *psbA1* génjének feltételezett fehérje termékének D1' elnevezését indokolja (51-53). Az *A. marina* PsbA1 izoformája azonban nemcsak a három D1' szekvenciára jellemző aminosav cserét tartalmazza, hanem a D1<sub>m</sub> szekvenciától számottevően, 38.7 %-ban eltér (5.3. ábra). A D1' szekvencia inszerciós és deléciós események nyomát is tartalmazza. Az eltérő hosszúságú két izoforma az aminosav

szekvencia illesztés során eltérő számozást kapott. A D1'-ra vonatkozó számozást zárójelben tüntetünk fel. Az aminosav cserék többek között érintenek számos, a kristályszerkezet, valamint mutációs analízisek alapján azonosított funkciójú, konzervatív oldalláncot is. Ezen mutációk közül megemlítenénk a D1-Glu244 oldallánc cseréjét. D1-Glu244 oxigénatomja szükséges a nem-hem vas koordinációjáért felelős bikarbonátcsoporthoz kötéséhez (29), amely a  $Q_A$  és  $Q_B$  kinon akceptorok közötti elektrontranszportot segíti (145). A D1' izoformában a Glu244(247)Ala cseréből kifolyólag a bikarbonátligandumhoz szükséges oxigénatom hiányzik, ezért  $Q_A$  -  $Q_B$  elektrontranszport lépés bizonyára eltérő hatásokkal működhet (5.3. ábra). Kiemelkedő fontossággal bírnak továbbá az Asp170(173)Glu, Glu333(337)Ser és az Asp342(346)Thr mutációk (5.3. ábra). Ezek olyan konzervatív oldalláncokat érintenek, amelyek a kristályszerkezet alapján kétfogú, azaz bidentát ligandumként viselkednek (29). Az OEC ligáláshoz a D1 felől négy bidentát ligandum biztosított. A D1'-ban az Asp170(173) helyett található Glu, nagyobb térkitöltésű oldallánccal ugyan, de karboxilcsoportja révén továbbra is biztosítani képes a bidentát ligálást. A Glu333(337)Ser valamint az Asp342(346)Thr cserék azonban a D1'-ban a bidentát helyett csak monodentát ligandum létrejöttét biztosíthatják. A D1-Asp61 az OEC számára egy feltételezett proton csatornát biztosít (29). A D1' fehérjében ezt egy glutamil oldallánc helyettesíti (D1'-Glu64), amely szintén rendelkezik a protoncsatorna létrejöttéért felelős karboxilcsoporttal, azonban valamivel nagyobb térkitöltéssel bír, így ebben az izoformában feltehetően eltérő sebességgel hagyhatják el a protonok a Mn-komplexet. Ezenkívül, az OEC komplexben található  $Cl^-$ -ion is feltehetően elősegíti a protonok távozását a vízbontó komplexből (146). A D1-Asp338(442) nitrogénatomja biztosítja a  $Cl^-$ -ion koordinációjához szükséges ligandumot. Az *A. marina* PsbA1 szekvenciájában a D1-Asp338(442) feltételezett funkcióját egy imidazol oldalláncban található nitrogénatom válthatja fel (5.3. ábra). Az *A. marina* D1' szekvenciája tehát számos olyan aminosav oldallánc cserét tartalmaz, amely a konzervatív aminosav oldalláncok feltételezett funkcióját eltérő módon ugyan, de képes lehet betölteni.

A *psbA1* gén DBMIB kezelés hatására mutatott nagyfokú kifejeződése arra utal, hogy bizonyos környezeti feltételek mellett ez a gén jelentősen aktiválódhat, és aktivált promótere nagy mennyiségű transzkript átíródását teszi lehetővé. Ez a jelenség a D1' PSII komplexekben betöltött feltételezett, speciális funkciójával hozható kapcsolatba. A DBMIB jelenlétében tapasztalt nagymértékű transzkript felhalmozódás ellenére a D1' fehérje funkcióját azonosítani nem tudtunk. Kísérletes bizonyítás hiányában az *A. marina* D1' fehérjének fiziológiai szerepével kapcsolatban a következők feltételezhetőek:

- (1.) Speciális környezeti viszonyokhoz való alkalmazkodás közben a PSII működésének finomhangolásában lehet szerepe. Ezt a hipotézist támasztja alá a *psbA1* gén DBIMB kezelésre mutatott specifikus és egyedülálló indukciója, valamint a fent említett aminosav oldallánc cserék feltételezett irányítottsága.
- (2.) Feltételezhetjük, hogy ez a D1' egy ősi izoforma, amely már elvesztette szerepét az *A. marina* fotoszintézisének evolúciója során, azonban a genomból még nem szelektálódott ki. Szerepe, és kifejeződése folyamatosan háttérbe szorult, ezért a génjét érő szelekciós nyomás lecsökkent, amely random mutációk felhalmozódását idézte elő. Ennek következtében végül elvesztette funkcióját. Ez ellen szól az, hogy a szekvenciát érő legalább három inszerciós/deléciós esemény nem eredményezte a „frameshift” jelenségét, azaz a hármas nukleotid kódolási egységek nem csúsztak el, és a DNS szekvencia továbbra is egy feltételezett D1 fehérjét kódol. Az is a random mutációk ellen szól, hogy több faj rendelkezik olyan származtatott PsbA szekvenciával, amely ugyanabban a pozícióban hasonló, illetve bizonyos helyeken - elsősorban az OEC körül – azonos aminosav cseréket mutat (54).
- (3.) Az *A. marina* PsbA1 izoformájának egy feltételezett funkciója az, hogy működésképtelen legyen. A James W. Murray által először megfogalmazott elmélet szerint egy úgynevezett rD1 izoformának felel meg, melyet a sejt arra használ, hogy gyorsan és hatékonyan működésképtelenné tegye PSII komplexét (54). Az rD1 tartalmú, OEC kötésre képtelen PSII oxigénfejlesztése leáll, és a sejtben a respirációs aktivitás révén alacsony oxigén koncentráció érhető el, amely az anaerob környezetben aktívvá váló enzimeknek, például hidrogenázoknak kedvez.

A *Synechocystis* szintén rendelkezik egy kontroll körülmények között csendes, anaerob környezetben viszont aktiválódó D1' izoformát kódoló génnel, amely azonban az *A. marina psbA1* génjével ellentétben nem mutat DBMIB-függő kifejeződést (nincs feltüntetve). Megfigyelték továbbá, hogy a *Cyanosphaera* sp. ATCC 51142 D1' izoformája, amelynek szekvenciája jelentős hasonlóságot mutat *A. marina* D1' izoformájával, diurnális kifejeződést mutat, és sötétben aktiválódik (147). A D1' különböző fajokban eltérő kifejeződési mintázata a többféle típusú szabályozásra és funkciójára utal.

A D1 szekvenciák sokfélesége, valamint a fehérjén végzett mutációs analízisek arra engednek következtetni, hogy a D1' alegység nagyfokú variabilitással bír, és kiterjedt



génjei egy operonról íródnak át, a sötét-anaerob, valamint DBMIB-anaerob kezelés eltérő szintű génkifejeződést vált ki: a *hoxE* és *hoxF* gének transzkripciója körülbelül négyszeresen meghaladja a többi *hox* gén kifejeződését (4.10, 4.11. ábra). Ez a jelenség egy *hoxU*-tól „upstream” található alternatív stop kodon jelenlétére utal. A Hox hidrogenázban az alegységek egymáshoz viszonyított aránya azonos, ezért a *hoxE* és a *hoxF* sötét-anaerob, valamint DBMIB-anaerob hatásra jelentkező eltérő mRNS kvantitása jelentheti azt, hogy az adott körülmények között ezen alegységek magasabb „turn-over” sebességgel rendelkeznek. Egy másik lehetséges magyarázat erre a jelenségre az, hogy a HoxE és HoxF nemcsak a hidrogenáz strukturális alegységeiként működhet, hanem bizonyos körülmények között más folyamatban, más komplex funkciójában is szerepet játszhat. A Hox hidrogenáz diaforáz funkcionális egységét alkotó Hox(E)FU alegységei erős homológiát mutatnak az NDH-1 komplex azon alegységeivel, amelyek minden más, oxigén alapú respirációt folytató organizmusban megtalálhatóak, azonban kloroplasztisban és cianobakteriális rendszerekben meglétüket ez idáig nem sikerült igazolni (107-109). Egy elsősorban szekvencia homológián alapuló elképzelés szerint a diaforáz alegység a cianobakteriális NDH-1 komplex működésében vehet részt, pótolva a hiányzó három alegységet (93,107,109). Ez a feltételezés azonban továbbra is vita tárgyát képezi (108,110). Elképzelhető, hogy a HoxE és a HoxF diaforáz alegységek sötét-anaerob, valamint DBMIB-anaerob kezelés során egy speciális funkciót látnak el az NDH-1 komplex működésében.

A *Synechocystis* hidrogenáz génjei tehát oxigénhiányos környezetben aktiválódnak, amikor maga az enzim is működőképes. A *marina* hidrogénfejlését is oxigénmentes környezetben mutatták ki, tehát nagy valószínűséggel ez az enzim is, a *Synechocystis* kétirányú hidrogenázához hasonlóan oxigén szenzitív (111). Ennek ellenére az *A. marina* *hox* génjei oxigén jelenlétében, sötétben mutatják a legerősebb transzkripciós aktivitást (4.13. ábra). A *hox* gének aktiválódása aerob körülmények között nehezen összeegyeztethető az oxigén Hox enzimre gyakorolt inaktíváló hatásával. Az NDH-1 komplex a respirációs elektrontranszportban kulcsfontosságú szerepet tölt be. Sötét-aerob környezetben az *A. marina* sejtek különösen intenzív respirációval rendelkeznek (4.3. ábra). A fokozott respirációs aktivitással párhuzamos *hox* gén aktiváció alátámasztja azt az elképzelést, amely szerint egyes Hox alegységek nem csak a hidrogenáz enzim (amely az adott körülmények alatt inaktív), hanem bizonyos esetekben az NDH-1 komplex alegységeként, vagy azzal szoros összefüggésben is funkcionálhatnak.

Az *A. marina* esetében a *hox* gének aktivációja és a PQ kioxidálása egy időben zajlik. Nemcsak sötétben, hanem alacsony intenzitású, vagy távoli vörös hullámhosszú fény hatására is jelentős *hox* gén aktivációt mértünk. Feltételezhető tehát, hogy a Hox enzim szerepet játszik ezen eltérő fényviszonyokhoz való alkalmazkodásban. *Synechocystis* esetében a kétirányú hidrogenáz fotoszintetikus elektrontranszporttal kapcsolt működését már korábban igazolták. Jens Appel hipotézise szerint az anaerob környezetben túlredukálódott elektrontranszport komponensek redox egyensúlyának visszaállításában lehet a Hox hidrogenáznak szerepe. Eszerint a *Synechocystis* tilakoid membránjához lazán kötött enzim többlet protonokat és elektronokat szabadít fel az elektrontranszportból, melyeket hidrogéngázzá konvertál, így segítve elő a fotofoszfórilációs elektrontranszport optimális lefolyását (95).

Az *A. marina* *hox* génjeinek transzkripció mintázata a *Synechococcus hoxEF* és *hoxUYH* operonjainak kifejeződésével analóg, és mindkét organizmusban a HoxU alegység kifejeződése a legintenzívebb (4.14. ábra). A *Synechococcus* HoxU alegységének feltételezett szerepe a Hox és az NDH-1 komplex közötti kapcsolat biztosítása (107). Egyes feltételezések szerint a *Synechococcus* Hox hidrogenáza úgy vesz részt a sejt energiaháztartásában, hogy a  $H_2$  oxidálásából származó elektronokat a respirációs elektrontranszport láncba tölti (151,152). Elképzelhető, hogy az *A. marina* esetében a Hox hidrogenáz a tilakoid membránban szorosan kapcsolt respirációs és fotofoszfórilációs elektrontranszport láncba, a *Synechococcus*-éhoz hasonló módon elektronok betöltését végzi. Ezzel a működési elvvel vesz részt az eltérő fényviszonyokhoz történő adaptációban, és a *Synechocystis* Hox enziméhez hasonlóan elektrontranszport „pacemaker”-ként működik, azaz egyes komponensek redox állapotának szinkronizálásával optimalizálja a tilakoid membránban zajló elektrontranszportot.

Az a tény, hogy a *hox* gének kifejeződését számos különböző tényező befolyásolhatja, valamint az, hogy az átíródását szabályzó fehérjék sokrétű regulátorként működnek (104-106), a Hox hidrogenáz komplex fiziológiai funkciójára és az energiaháztartásban betöltött általános szerepére utal. A *hox* gének különböző fajokban eltérő kifejeződési mintázatot mutatnak, és a fehérje sejten belüli lokalizációja is fajoként változhat (91). A kétirányú hidrogenáz működése és fiziológiai szerepe tehát feltételezhetően az egyes fajokban eltérő lehet. A két egysejtes cianobaktérium, a *Synechocystis* és az *A. marina* törzsben a Hox enzim strukturális génjeinek elrendeződése nagymértékű hasonlóságot mutat (1.10. ábra). Az *A. marina* *hox* génjeinek kifejeződési mintázata a *Synechococcus* *hox* operon átíródásával analóg (4.14. ábra). Ezzel szemben a

HoxU alegység aminosav szekvenciával elvégzett filogenetikai vizsgálata szerint az *A. marina* Hox enzime a *Synechococcus* és a *Synechocystis* hidrogenázával parafiletikus kapcsolatban áll, és a heterocisztás cianobaktériumok Hox hidrogenázával mutat közeli rokonságot (4.15. ábra). A jövőben e heterocisztás fajokban található Hox enzim transzkripció vizsgálatát tervezzük.

## 7. Az eredmények összefoglalása

1. Az *A. marina* sötét aerob respirációja igen intenzív, aminek következtében a cianobaktériumok nagy részétől eltérő módon sötét adaptáció során az *A. marina* tilakoid membránjában a  $PQH_2/PQ$  arány lecsökken. Szélsőségesen alacsony intenzitású megvilágítás során is a PQ állományt kioxidáló folyamatok kerülnek előnybe a PSII által történő PQ redukcióval szemben. A PSII centrumok szuperkomplexet alkotnak a 645 nm-en elnyelő PBP antennákkal, ezért a 720 nm hullámhosszú fény a PSI gerjesztés szempontjából kedvezőbb, így távoli vörös fényben szintén az oxidált PQ molekulák kerülnek túlsúlyba.

2. A 720 nm-es megvilágítás által történő hatékonyabb PSI gerjesztést a sejtek PSII állományuk megnövelésével, illetve PBP tartalmuk csökkentésével ellensúlyozzák. Az alacsony intenzitású látható fény begyűjtésének optimalizálására a *d*-Chl tartalmú Pcb antennákat érintő fehérjekörnyezettel összefüggésben álló kromatikus átrendeződést a *d*-Chl csúcsban mutatkozó vörös eltolódás jelzi.

3. Az *A. marina* nevelési körülmények között a PSII központi heterodimerének  $D1_m$  és  $D2_m$  izoformáit kódoló két *psbA* és két *psbD* génjét fejezi ki. Ezekről az abundáns fehérjéktől eltérő aminosav szekvenciájú  $D1'$  és  $D2'$  izoformákat kódoló *psbA1* és *psbD3* gének kifejeződése kontroll körülmények között elhanyagolható. Erős intenzitású fénystressz és UV-B sugárzás hatására a  $D1_m$  és  $D2_m$  izoformákat kódoló *psbA2*, *psbA3*, és *psbD2* transzkriptek relatív szintje megemelkedik.

4. Az *A. marina* alacsony intenzitású látható, valamint távoli vörös fényhez történő fotoszintetikus akklimációjában feltehetően szerepet játszik az addicionális  $D2'$  izoforma, amelynek *psbD3* génje e körülmények során aktiválódik.



5. A lineáris és ciklikus elektrontranszport gátlása a cit  $b_6/f$   $Q_o$  kötőhelyére beülő DBMIB-vel megakadályozza a  $D1_m$  és  $D2_m$  izoformákat kódoló *psbA2*, *psbA3* és *psbD2* gének fénystressz-aktivációját, és a  $D1'$  izoformát kódoló *psbA1* transzkript felhalmozódását idézi elő.

6. Az *A. marina* genomja a cit b559  $\alpha$  alegységét kódoló *psbE* gén két formáját, *psbE1* és *psbE2* homológokat tartalmaz, amelyek közül az utóbbi a relatív mRNS szintje alapján az abundáns kópia. A *psbE1* gén aktivitása rendkívül alacsony, és e homológ által kódolt feltételezett  $\alpha$ -cit b559 termék aminosav szekvenciájában mutációk halmozódtak fel. A *psbE1* géntől közvetlen „downstream” kódolt  $\beta$ -cit b559 kifejeződése a *psbE1* génhez hasonlóan elhanyagolható mértékű. A cit b559  $\alpha$  és  $\beta$  alegységek mennyisége között transzkriptom szinten két nagyságrendnyi különbség adódik.

7. A *Synechocystis* Hox hidrogenázának kifejeződését a fény, a fotoszintetikus elektrontranszport és az oxigén befolyásolja. Az *A. marina* hidrogenázának kifejeződése elsősorban a PQ-pool oxidálásával járó körülményekhez köthető, fiziológiai szerepe feltételezhetően a *Synechocystis* kétirányú hidrogenázához hasonlóan a tilakoid membránban zajló elektrontranszport finomhangolása.

## 8. A dolgozatban felhasznált közlemények

- É. Kiss, P. B. Kós, I. Vass, (2009) Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 J Biotechnol 142 (1):31-7
- É. Kiss, P. B. Kós, Min Chen I. Vass, (2010) The regulation of the bidirectional hydrogenase in different unicellular cyanobacterial strains Proceedings of 15th International Congress on Photosynthesis
- É. Kiss, P. B. Kós, Min Chen I. Vass, (2012) A unique regulation of the expression of the *psbA*, *psbD*, and *psbE* genes, encoding the D1, D2 and cytochrome b559 subunits of the Photosystem II complex in the chlorophyll *d* containing cyanobacterium *Acaryochloris marina* BBA Bioenergetics <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabo.2012.04.010>

## 9. Irodalomjegyzék

1. **Whitton, B. A. and M. Potts.** 2000. The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space. Springer .
2. **Banerjee, M., R. C. Everroad, and R. W. Castenholz.** 2009. An unusual cyanobacterium from saline thermal waters with relatives from unexpected habitats. *Extremophiles* **13**:707-716.
3. **Kompantseva, E. I., D. Y. Sorokin, V. M. Gorlenko, and B. B. Namsaraev.** 2005. The phototrophic community found in Lake Khilganta (an alkaline saline lake located in the southeastern Transbaikalian Region). *Microbiology* **74**:352-361.
4. **Rocap, G., F. W. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N. A. Ahlgren, A. Arellano, M. Coleman, L. Hauser, W. R. Hess, Z. I. Johnson, M. Land, D. Lindell, A. F. Post, W. Regala, M. Shah, S. L. Shaw, C. Steglich, M. B. Sullivan, C. S. Ting, A. Tolonen, E. A. Webb, E. R. Zinser, and S. W. Chisholm.** 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* **424**:1042-1047.
5. **Andersson, B. and S. Styring.** 1991. Photosystem II: molecular organization, function, and acclimation. *Curr. Top. Bioenerg.* **16**:1-81.
6. **Sailaja, M. V. and V. S. M. Das.** 1995. Photosystem II acclimation to limiting growth light in fully developed leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. and NAD-ME C4 plant. *Photosynth. Res.* **46**:227-233.
7. **Walters, R. G. and P. Horton.** 1995. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: Changes in photosynthetic function. *Planta* **197**:306-312.
8. **Golden, S. S.** 1995. Light-responsive gene expression in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **177**:1651-1654.
9. **Mulo, P., C. Sicora, and E. M. Aro.** 2009. Cyanobacterial *psbA* gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**:3697-3710.
10. **Miyashita, H., H. Ikemoto, N. Kurano, K. Adachi, M. Chilara, and S. Miyachi.** 1996. Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature* **383**:402.
11. **Gloag, R. S., R. J. Ritchie, M. Chen, A. W. D. Larkum, and R. G. Quinnell.** 2007. Chromatic photoacclimation, photosynthetic electron transport and oxygen evolution in the Chlorophyll *d*-containing oxyphotobacterium *Acaryochloris marina*. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**:127-135.
12. **Duxbury, Z., M. Schliep, R. J. Ritchie, A. W. D. Larkum, and M. Chen.** 2009. Chromatic photoacclimation extends utilisable photosynthetically active radiation

in the chlorophyll *d*-containing cyanobacterium, *Acaryochloris marina*. Photosynth. Res. **101**:69-75.

13. **Cyanobase**. 2007. <http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/index.html>.
14. **Swingley, W. D., M. Chen, P. C. Cheung, A. L. Conrad, L. C. Dejesa, J. Hao, B. M. Honchak, L. E. Karbach, A. Kurdoglu, S. Lahiri, S. D. Mastrian, H. Miyashita, L. Page, P. Ramakrishna, S. Satoh, W. M. Sattley, Y. Shimada, H. L. Taylor, T. Tomo, T. Tsuchiya, Z. T. Wang, J. Raymond, M. Mimuro, R. E. Blankenship, and J. W. Touchman**. 2008. Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll *d*-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105**:2005-2010.
15. **Miller, S. R., A. M. Wood, R. E. Blankenship, M. Kim, and S. Ferriera**. 2011. Dynamics of gene duplication in the genomes of chlorophyll *d*-producing cyanobacteria: Implications for the ecological niche. Genome Biology and Evolution **3**:601-613.
16. **Roth J. R. et al**. 1996. Rearrangements of the bacterial chromosome: Formation and applications. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Washington (DC): ASM Press.
17. **Romero, D. and R. Palacios**. 1997. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. Annual Review of Genetics **31**:91-111.
18. **Debashish Bhattacharya**. 1998. Origins of Algae and their Plastids. Springer .
19. **Campbell, D., V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustafsson, and G. Öquist**. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:667-683.
20. **Robert E. Blankenship**. 2002. Molecular mechanisms of photosynthesis. Blackwell.
21. **Adir, N**. 2005. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. Photosynth. Res. **85**:15-32.
22. **Clarke, A. K., D. Campbell, P. Gustafsson, and G. Oquist**. 1995. Dynamic-responses of Photosystem-II and phycobilisomes to changing light in the cyanobacterium *Synechococcus* Sp PCC 7942. Planta **197**:553-562.
23. **Hess, W. R., G. Rocap, C. S. Ting, F. Larimer, S. Stilwagen, J. Lamerdin, and S. W. Chisholm**. 2001. The photosynthetic apparatus of *Prochlorococcus*: Insights through comparative genomics. Photosynth. Res. **70**:53-71.
24. **Larkum, T. and C. J. Howe**. 1997. Molecular aspects of light-harvesting processes in algae. Advances in Botanical Research, Vol 27 **27**:257-330.
25. **LaRoche, J., G. W. M. vanderStaay, F. Partensky, A. Ducret, R. Aebersold, R. Li, S. S. Golden, R. G. Hiller, P. M. Wrench, A. W. D. Larkum, and B. R. Green**. 1996. Independent evolution of the prochlorophyte and green plant

chlorophyll a/b light-harvesting proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**:15244-15248.

26. **Chen, M. and T. S. Bibby.** 2005. Photosynthetic apparatus of antenna-reaction centres supercomplexes in oxyphotobacteria: Insight through significance of Pcb/IsiA proteins. Photosynth. Res. **86**:165-173.
27. **Dekker, J. P. and R. Van Grondelle.** 2000. Primary charge separation in Photosystem II. Photosynth. Res. **63**:195-208.
28. **Cardona, T., A. Sedoud, N. Cox, and A. W. Rutherford.** 2012. Charge separation in Photosystem II: A comparative and evolutionary overview. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1817**:26-43.
29. **Umena, J., K. Kawakami, J.-R. Shen, and N. Kamiya.** 2010. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution 1.9 Å. Nature **473**:55-60.
30. **Calvin, M.** 1997. Forty years of photosynthesis and related activities. Interdisciplinary Science Reviews **22**:138-148.
31. **Bendall, D. S. and R. S. Manasse.** 1995. Cyclic photophosphorylation and electron transport. Biochim. Biophys. Acta **1229**:23-38.
32. **Escoubas, J. M., M. Lomas, J. LaRoche, and P. G. Falkowski.** 1995. Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**:10237-10241.
33. **Tsimilli-Michael, M., K. Stamatakis, and G. C. Papageogiou.** 2009. Dark-to-light transition in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells studied by fluorescence kinetics assesses plastoquinone redox poise in the dark and photosystem II fluorescence component and dynamics during state 2 to state 1 transition. Photosynth. Res. **99**:243-255.
34. **Gong, H. and I. Ohad.** 1996. The PQ/PQH<sub>2</sub> ratio and occupancy of Photosystem II-Q<sub>B</sub> site by plastoquinone control the degradation of D1 protein during photoinhibition *in vivo*. J. Biol. Chem. **266**:21293-21299.
35. **Ahrling, K. A. and S. Peterson.** 2003. Light-adaptation of Photosystem II is mediated by the plastoquinone pool. Biochemistry **42**:7655-7662.
36. **Meunier, P. C. and R. Popovic.** 1990. Control of misses in oxygen evolution by the oxido-reduction state of plastoquinone in *Dunaliella tertiolecta*. Photosynth. Res. **23**:213-221.
37. **Mullineaux, C. W. and J. F. Allen.** 1986. The state-2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus*-6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. FEBS Lett. **205**:155-160.
38. **Schultze, M., B. Forberich, S. Rexroth, N. G. Dyczmons, M. Roegner, and J. Appel.** 2009. Localization of cytochrome b(6)f complexes implies an incomplete respiratory chain in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics **1787**:1479-1485.

39. **Ting, C. S., M. E. Ramsey, Y. L. Wang, A. M. Frost, E. Jun, and T. Durham.** 2009. Minimal genomes, maximal productivity: comparative genomics of the photosystem and light-harvesting complexes in the marine cyanobacterium, *Prochlorococcus*. *Photosynth. Res.* **101**:1-19.
40. **Sicora, C., S. E. Appleton, C. M. Brown, J. Chung, J. Chandler, A. M. Cockshutt, I. Vass, and D. A. Campbell.** 2006. Cyanobacterial *psbA* families in *Anabaena* and *Synechocystis* encode trace, constitutive and UVB-induced D1 isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**:47-56.
41. **Kamata, T., H. Hiramoto, N. Morita, J.-R. Shen, N. H. Mann, and Y. Yamamoto.** 2005. Quality control of Photosystem II: an FtsH protease plays an essential role in the turnover of the reaction center D1 protein in *Synechocystis* PCC 6803 under heat stress as well as light stress conditions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**:983-990.
42. **Campbell, D., G. Q. Zhou, P. Gustafsson, G. Oquist, and A. K. Clarke.** 1995. Electron transport regulates exchange of two forms of photosystem II D1 protein in the cyanobacterium *Synechococcus*. *EMBO J.* **14**:5457-5466.
43. **Campbell, D., M.-J. Erikson, G. Öquist, P. Gustafsson, and A. K. Clarke.** 1998. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging Photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:364-369.
44. **Öquist, G., D. Campbell, A. K. Clarke, and P. Gustafsson.** 1995. The cyanobacterium *Synechococcus* modulates Photosystem II function in response to excitation stress through D1 exchange. *Photosynth. Res.* **46**:151-158.
45. **Campbell, D., A. K. Clarke, P. Gustafsson, and G. Oquist.** 1999. Oxygen-dependent electron flow influences Photosystem II function and *psbA* gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 7942. *Physiol. Plant.* **105**:746-755.
46. **Sane, P. V., A. G. Ivanov, D. Sveshnikov, N. P. A. Huner, and G. Oquist.** 2002. A transient exchange of the Photosystem II reaction center protein D1:1 with D1:2 during low temperature stress of *Synechococcus* sp. PCC 7942 in the light lowers the redox potential of Q<sub>B</sub>. *J. Biol. Chem.* **277**:32739-32745.
47. **Sicora, C. I., C. M. Brown, O. Cheregi, I. Vass, and D. A. Campbell.** 2008. The *psbA* gene family responds differentially to light and UVB stress in *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a deeply divergent cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**:130-139.
48. **Kós, P. B., Zs. Deák, O. Cheregi, and I. Vass.** 2008. Differential regulation of *psbA* and *psbD* gene expression, and the role of the different D1 protein copies in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**:74-83.
49. **Sander, J., M. Nowaczyk, J. Buchta, H. Dau, I. Vass, Zs. Deak, M. Dorogi, M. Iwai, and M. Rögner.** 2010. Functional characterization and quantification of the

- alternative *PsbA* copies in *Thermosynechococcus elongatus* and their role in photoprotection. *J. Biol. Chem.* **285**:29851-29856.
50. **Salih, G. F. and C. Jansson.** 1997. Activation of the silent *psbAI* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803 produces a novel and functional D1 protein. *Plant Cell* **9**:869-878.
  51. **Summerfield, T. C., J. Toepel, and L. A. Sherman.** 2008. Low-oxygen induction of normally cryptic *psbA* genes in cyanobacteria. *Biochemistry* **47**:12939-12941.
  52. **Sicora, C. I., F. M. Ho, T. Salminen, S. Styring, and E.-M. Aro.** 2009. Transcription of a "silent" cyanobacterial *psbA* gene is induced by microaerobic conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**:105-112.
  53. **Summerfield, T. C., S. Nagarajan, and L. A. Sherman.** 2011. Gene expression under low-oxygen conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 demonstrates Hik31-dependent and -independent responses. *Microbiol.* **157**:301-312.
  54. **Murray, J. W.** 2012. Sequence variation at the oxygen-evolving centre of photosystem II: a new class of 'rouge' cyanobacterial D1 proteins. *Photosynth. Res.* doi:10.1007/s11120-011-9714-5.
  55. **Bustos, S. A. and S. S. Golden.** 1992. Light-regulated expression of the *psbD* gene family in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: evidence for the role of duplicated *psbD* genes in cyanobacteria. *Mol. Gen. Genet.* **232**:221-230.
  56. **Viczián, A., Z. Máté, F. Nagy, and I. Vass.** 2000. UV-B induced differential transcription of *psbD* genes encoding the D2 protein of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Photosynth. Res.* **64**:257-266.
  57. **Golden, S. S., J. Brusslan, and R. Haselkorn.** 1986. Expression of a family of *psbA* genes encoding a Photosystem II polypeptide in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *EMBO J.* **5**:2789-2798.
  58. **Stewart, D. H. and G. W. Brudvig.** 1998. Cytochrome b559 of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1367**:63-87.
  59. **Barber, J. and J. De Las Rivas.** 1993. A functional model for the role of cytochrome *b*<sub>559</sub> in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:10942-10946.
  60. **Chiu, Y.-F., W.-C. Lin, C.-M. Wu, Y.-H. Chen, C.-H. Hung, S.-C. Ke, and H.-A. Chu.** 2009. Identification and characterization of a cytochrome b<sub>559</sub> *Synechocystis* 6803 mutant spontaneously generated from DCMU-inhibited photoheterotrophical growth conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**:1179-1188.
  61. **Hung, C.-H., H. J. Hwang, Y.-H. Chen, Y.-F. Chiu, S.-C. Ke, R. L. Burnap, and H.-A. Chu.** 2010. Spectroscopic and functional characterizations of cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 mutants on and near the heme axial ligand of cytochrome b<sub>559</sub> in photosystem II. *J. Biol. Chem.* **285**:5653-5663.

62. **Magnuson, A., M. Rova, F. Mamedov, P.-O. Fredriksson, and S. Styring.** 1999. The role of cytochrome  $b_{559}$  and tyrosine D in protection against photoinhibition during *in vivo* photoactivation of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**:180-191.
63. **Shinopoulos, K. E. and G. W. Brudvig.** 2012. Cytochrome  $b_{559}$  and cyclic electron transfer within photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**:66-75.
64. **Luo, H. and J. J. Eaton-Rye.** 2008. Directed mutagenesis of the transmembrane domain of the PsbL subunit of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* **98**:337-347.
65. **Ohad, I., C. Dal Bosco, R. G. Herrmann, and J. Meurer.** 2004. Photosystem II proteins PsbL and PsbJ regulate electron flow to the plastoquinone pool. *Biochemistry* **43**:2297-2308.
66. **Suorsa, M., R. E. Regel, V. Paakkari, N. Battchikova, R. G. Herrmann, and E.-M. Aro.** 2004. Protein assembly of Photosystem II and accumulation of subcomplexes in the absence of low molecular mass subunits PsbL and PsbJ. *Eur. J. Biochem.* **271**:96-107.
67. **Mor, T. S., I. Ohad, J. Hirschenberg, and H. B. Pakrasi.** 1995. An unusual organization of the genes encoding cytochrome  $b_{559}$  in *Chlamydomonas reinhardtii*: psbE and psbF genes are separately transcribed from different regions of the plastid chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **246**:600-604.
68. **Manning, W. M. and S. H. H.** 1943. Chlorophyll d: a green pigment in red algae. *J. Biol. Chem.* **151**:1-19.
69. **Kashiyama, Y., H. Miyashita, S. Ohkubo, N. O. Ogawa, Y. Chikaraishi, Y. Takano, H. Suga, T. Toyofuku, H. Nomaki, H. Kitazato, T. Nagata, and N. Ohkouchi.** 2008. Evidence of global chlorophyll *d*. *Science* **321**:658.
70. **Blankenship, R. E. and H. Hartman.** 1998. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **23**:94-97.
71. **Chen, M., M. Schliep, R. D. Willows, Z. L. Cai, B. A. Neilan, and H. Scheer.** 2010. A Red-shifted chlorophyll. *Science* **329**:1318-1319.
72. **Marquardt, J., E. Morschel, E. Rhiel, and M. Westermann.** 2000. Ultrastructure of *Acaryochloris marina*, an oxyphotobacterium containing mainly chlorophyll *d*. *Archives of Microbiology* **174**:181-188.
73. **Miller, S. R., S. Augustine, T. Le Olson, R. E. Blankenship, J. Selker, and A. M. Wood.** 2005. Discovery of a free-living chlorophyll *d*-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:850-855.
74. **Miyashita, H., H. Ikemoto, N. Kurano, S. Miyachi, and M. Chihara.** 2003. *Acaryochloris marina* gen. et. sp. nov. (Cyanobacteria), an oxygenic photosynthetic prokaryote containing chl *d* as a major pigment. *J. Phycol.* **39**:1247-1253.



75. **Mohr, R., B. Voss, M. Schliep, T. Kurz, I. Maldener, D. G. Adams, A. D. W. Larkum, M. Chen, and W. R. Hess.** 2010. A new chlorophyll *d*-containing cyanobacterium: evidence for niche adaptation in the genus *Acaryochloris*. *Isme Journal* **4**:1456-1469.
76. **Kuhl, M., M. Chen, P. J. Ralph, U. Schreiber, and A. W. D. Larkum.** 2005. A niche for cyanobacteria containing chlorophyll *d*. *Nature* **433**:820.
77. **Larkum, A. W. D. and M. Kühl.** 2005. Chlorophyll *d*: the puzzle resolved. *Trends Plant Sci.* **10**:355-357.
78. **Ohashi, S., H. Miyashita, N. Okada, T. Iemura, T. Watanabe, and M. Kobayashi.** 2008. Unique photosystems in *Acaryochloris marina*. *Photosynth. Res.* **98**:141-149.
79. **Hu, Q., H. Miyashita, I. Iwasaki, N. Kurano, S. Miyachi, M. Iwaki, and S. Itoh.** 1998. A Photosystem I reaction center driven by chlorophyll *d* in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13319-13323.
80. **Tomo, T., S. I. Allakhverdiev, and M. Mimuro.** 2011. Constitution and energetics of photosystem I and photosystem II in the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *J. Photochem. Photobiol. B.* **104**:333-340.
81. **Theiss, C., F. J. Schmitt, J. Pieper, C. Nganou, M. Grehn, M. Vitali, R. Olliges, H. J. Eichler, and H. J. Eckert.** 2011. Excitation energy transfer in intact cells and in the phycobiliprotein antennae of the chlorophyll *d* containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *J. Plant Physiol.* **168**:1473-1487.
82. **Chen, M., R. G. Quinnell, and A. W. D. Larkum.** 2002. The major light-harvesting pigment protein of *Acaryochloris marina*. *FEBS Lett.* **514**:149-152.
83. **Anthony W.D.Larkum.** 2004. Light-Harvesting Systems in Algae. *Advances in Photosynthesis and Respiration* **14**:277-304.
84. **Tomo, T., T. Okubo, S. Akimoto, M. Yokono, H. Miyashita, T. Tsuchiya, T. Noguchi, and M. Mimuro.** 2007. Identification of the special pair of Photosystem II in a chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:7283-7288.
85. **Schlodder, E., M. Çetin, H.-J. Eckert, F.-J. Schmitt, J. Barber, and A. Telfer.** 2007. Both chlorophylls *a* and *d* are essential for the photochemistry in Photosystem II of the cyanobacteria, *Acaryochloris marina*. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**:589-595.
86. **Itoh, S., H. Mino, K. Itoh, T. Shigenaga, T. Uzumaki, and M. Iwaki.** 2007. Function of chlorophyll *d* in reaction centers of Photosystems I and II of the oxygenic photosynthesis of *Acaryochloris marina*. *Biochemistry* **46**:12473-12481.
87. **Chen, M., T. S. Bibby, J. Nield, A. W. D. Larkum, and J. Barber.** 2005. Structure of a large photosystem II supercomplex from *Acaryochloris marina*. *FEBS Lett.* **579**:1306-1310.

88. **Chen, M., M. Floetenmeyer, and T. S. Bibby.** 2009. Supramolecular organization of phycobiliproteins in the chlorophyll *d*-containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *FEBS Lett.* **583**:2535-2539.
89. **Chen, M., T. S. Bibby, J. Nield, A. Larkum, and J. Barber.** 2005. Iron deficiency induces a chlorophyll *d*-binding Pcb antenna system around Photosystem I in *Acaryochloris marina*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1708**:367-374.
90. **Tamagnini, P., R. Axelsson, P. Lindberg, F. Oxelfelt, and P. Lindblad.** 2002. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:1-20.
91. **Eisbrenner, G., P. Roos, and H. Bothe.** 1981. The Number of Hydrogenases in Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **125**:383-390.
92. **Appel, J., S. Phunprunch, K. Steinmüller, and R. Schulz.** 2000. The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch. Microbiol.* **173**:333-338.
93. **Appel, J. and R. Schulz.** 1996. Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1298**:141-147.
94. **Troshina, O., L. T. Serebryakova, M. E. Sheremetieva, and P. Lindblad.** 2002. Production of H<sub>2</sub> by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* **27**:1283-1289.
95. **Appel, J. and R. Schulz.** 1998. Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poisoning? *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **47**:1-11.
96. **Ferreira, D., F. Pinto, P. Moradas-Ferreira, M. V. Mendes, and P. Tamagnini.** 2009. Transcription profiles of hydrogenases related genes in the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4. *Bmc Microbiology* **9**.
97. **Schmitz, O., G. Boison, and H. Bothe.** 2001. Quantitative analysis of expression of two circadian clock-controlled gene clusters coding for the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol. Microbiol.* **41**:1409-1417.
98. **Tamagnini, P., E. Leitão, P. Oliveira, D. Ferreira, F. Pinto, D. J. Harris, T. Heidorn, and P. Lindblad.** 2007. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**:692-720.
99. **Cournac, L., G. Guedeney, G. Peltier, and P. M. Vignais.** 2004. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.* **186**:1737-1746.

100. **Antal, T. K., P. Oliveira, and P. Lindblad.** 2006. The bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Int. J. Hydrogen Energy* **31**:1439-1444.
101. **Oliveira, P. and P. Lindblad.** 2005. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**:x-xx.
102. **Gutekunst, K., S. Phunpruch, C. Schwarz, S. Schuchardt, R. Schulz-Friedrich, and J. Appel.** 2005. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. *Mol. Microbiol.* **58**:810-823.
103. **Oliveira, P. and P. Lindblad.** 2008. An AbrB-like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **190**:1011-1019.
104. **Ishii, A. and Y. Hihara.** 2008. An AbrB-like transcriptional regulator, slh0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **148**:660-670.
105. **Patterson-Fortin, L. M., K. R. Colvin, and G. W. Owttrim.** 2006. A LexA-related protein regulates redox-sensitive expression of the cyanobacterial RNA helicase, *crhR*. *Nucleic. Acids Res.* **34**:3446-3454.
106. **Domain, F., L. Houot, F. Chauvat, and C. Cassier-Chauvat.** 2004. Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. *Mol. Microbiol.* **53**:65-80.
107. **Schmitz, O. and H. Bothe.** 1996. The diaphorase subunit HoxU of the bidirectional hydrogenase as electron transferring protein in cyanobacterial respiration? *Naturwissenschaften* **83**:525-527.
108. **Boison, G., O. Schmitz, B. Schmitz, and H. Bothe.** 1998. Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of its diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Curr. Microbiol.* **36**:253-258.
109. **Walker, J. E.** 1992. The Nadh - Ubiquinone Oxidoreductase (Complex-I) of Respiratory Chains. *Quarterly Reviews of Biophysics* **25**:253-324.
110. **Boison, G., H. Bothe, A. Hansel, and P. Lindblad.** 1999. Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:159-165.
111. **Boichenko, V. A., V. V. Klimov, H. Miyashita, and S. Miyachi.** 2000. Functional characteristics of chlorophyll *d*-predominating photosynthetic apparatus in intact cells of *Acaryochloris marina*. *Photosynth. Res.* **65**:269-277.
112. **Ritchie, R. J.** 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* **89**:27-41.

113. **Mohamed, A. and C. Jansson.** 1989. Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **13**:693-700.
114. **Schmittgen, T. D. and K. J. Livak.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols* **3**:1101-1108.
115. **Scheffe, J. H., K. E. Lehmann, I. R. Buschmann, T. Unger, and H. Funke-Kaiser.** 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C(T) difference" formula. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **84**:901-910.
116. **NCBI.** 2012. NCBI protein database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
117. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
118. **Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, and O. Gascuel.** 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**:307-321.
119. **Huson, D. H., D. C. Richter, C. Rausch, T. Dezulian, M. Franz, and R. Rupp.** 2007. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *Bmc Bioinformatics* **8**.
120. **Allen, J. F.** 1995. Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Physiol. Plantarum* **93**:196-205.
121. **Allen, J. F., K. Alexciev, and G. Kakansson.** 1995. Regulation by redox signalling. *Curr. Biol.* **5**:869-873.
122. **Bissati, E. K. and D. Kirilovsky.** 2001. Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis* species PCC 6803. A redox control mechanism. *Plant Physiol.* **125**:1988-2000.
123. **Alfonso, M., I. Perewoska, and D. Kirilovsky.** 2000. Redox control of *psbA* gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex. *Plant Physiol.* **122**:505-515.
124. **Mulo, P., I. Sakurai, and E.-M. Aro.** 2012. Strategies for *psbA* gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: From transcription to PSII repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**:247-257.
125. **Van Waasbergen, L. G., N. Dolganov, and A. R. Grossman.** 2002. *nblS*, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **184**:2481-2490.

126. **Pfannschmidt, T. and K. Liere.** 2005. Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**:607-618.
127. **Govindjee.** 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**:131-160.
128. **Papageorgiou, G. C., M. Tsimilli-Michael, and K. Stamatakis.** 2007. The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. *Photosynth. Res.* **94**:275-290.
129. **Strasser, R. J., A. Srivastava, and Govindjee.** 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* **61**:32-42.
130. **Goltsev, V., I. Zaharieva, P. Lambrev, I. Yordanov, and R. Strasser.** 2007. Simultaneous analysis of prompt and delayed chlorophyll *a* fluorescence in leaves during the induction period of dark to light adaptation. *J. Theor. Biol.* **225**:171-183.
131. **Tsinoremas, N. F., M. R. Schaefer, and S. S. Golden.** 1994. Blue and red light reversibly control *psbA* expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Biol. Chem.* **269**:16143-16147.
132. **Vignais, P. M., L. Cournac, E. C. Hatchikian, S. Elsen, L. Serebryakova, N. Zorin, and B. Dimon.** 2002. Continuous monitoring of the activation and activity of [NiFe]-hydrogenases by membrane-inlet mass spectrometry. *Int. J. Hydrogen Energy* **27**:1441-1448.
133. **Antal, T. K. and P. Lindblad.** 2005. Production of H<sub>2</sub> by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J. Appl. Microbiol.* **98**:114-120.
134. **Sjoholm, J., P. Oliveira, and P. Lindblad.** 2007. Transcription and regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:5435-5446.
135. **Boison, G., H. Bothe, and O. Schmitz.** 2000. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. *Current Microbiology* **40**:315-321.
136. **Tamagnini, P., F. Oxelfelt, R. Salema, and P. Lindblad.** 1995. Immunological characterization of hydrogenases in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Nostoc* Sp Strain Pcc-73102. *Current Microbiology* **31**:102-107.
137. **Anderson, R. P. and J. R. Roth.** 1977. Tandem Genetic Duplications in Phage and Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **31**:473-505.
138. **Reams, A. B., E. Kofoed, M. Savageau, and J. R. Roth.** 2010. Duplication frequency in a population of *Salmonella enterica* rapidly approaches steady state with or without recombination. *Genetics* **184**:1077-1094.

139. **Lynch, M. and J. S. Conery.** 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**:1151-1155.
140. **Hooper, S. D. and O. G. Berg.** 2003. Duplication is more common among laterally transferred genes than among indigenous genes. *Genome Biology* **4**.
141. **Mullineaux, C. W.** 1994. Excitation-energy transfer from phycobilisomes to Photosystem-I in a cyanobacterial mutant lacking Photosystem-II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1184**:71-77.
142. **Mullineaux, C. W.** 1992. Excitation-energy transfer from phycobilisomes to Photosystem-I and Photosystem-II in a cyanobacterium. *Photosynth. Res.* **34**:114.
143. **Barber, J., E. P. Morris, and P. C. A. da Fonseca.** 2003. Interaction of the allophycocyanin core complex with photosystem II. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2**:536-541.
144. **McNamara, V. P., F. S. Sutterwala, H. B. Pakrasi, and J. Whitmarsh.** 1997. Structural model of cytochrome  $b_{559}$  in photosystem II based on a mutant with genetically fused subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:14173-14178.
145. **van Rensen, J. J. S., C. Xu, and Govindjee.** 1999. Role of bicarbonate in Photosystem II, the water-plastoquinone oxido-reductase of plant photosynthesis. *Physiol. Plantarum* **105**:585-592.
146. **Charles, F.** 2008. The calcium and chloride requirements of the  $O_2$  evolving complex. *Coordination Chemistry Reviews* **252**:296-305.
147. **Stoeckel, J., E. A. Welsh, M. Liberton, R. Kunnvakkam, R. Aurora, and H. B. Pakrasi.** 2008. Global transcriptomic analysis of *Cyanothece* 51142 reveals robust diurnal oscillation of central metabolic processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:6156-6161.
148. **Clausen, J., S. Winkler, A. M. A. Hays, M. Hundelt, R. J. Debus, and W. Junge.** 2001. Photosynthetic water oxidation in *Synechocystis* sp PCC6803: mutations D1-E189K, R and Q are without influence on electron transfer at the donor side of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1506**:224-235.
149. **Debus, R. J.** 2001. Amino acid residues that modulate the properties of tyrosine  $Y_Z$  and the manganese cluster in the water oxidizing complex of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1503**:164-186.
150. **Kless, H. and W. Vermaas.** 1995. Many combinations of amino acid sequences in a conserved region of the D1 protein satisfy Photosystem II function. *J. Mol. Biol.* **246**:120-131.
151. **Kentemich, T., M. Casper, and H. Bothe.** 1991. The reversible hydrogenase in *Anacystis Nidulans* is a component of the cytoplasmic membrane. *Naturwissenschaften* **78**:559-560.

152. **Schmitz, O., G. Boison, R. Hilscher, B. Hundeshagen, W. Zimmer, F. Lottspeich, and H. Bothe.** 1995. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* **233**:266-276.

## Összefoglalás

A cianobakteriális hidrogenázok jelentősége napjainkban előtérbe helyeződött az alternatív energia utak kutatása kapcsán. Az egyik biotechnológiai elgondolás megvalósítaná, hogy a fény által meghajtott fotoszintézis állítsa elő a hidrogénfejlesztéshez szükséges elektronokat és protonokat. A jelen tanulmány e vízbontáson alapuló elképzelés két kulcsenzimének, a Hox hidrogenáznak valamint a kettes fotokémiai rendszer (PSII) reakciócentrumának génkifejeződését vizsgálja *Acaryochloris marina*, tengeri cianobaktérium fajban.

A fotoszintetizáló prokarióta szervezetek rendkívül adaptívak, számos mechanizmust kifejlesztettek, hogy védjék magukat a környezeti stressz hatásoktól. A cianobaktériumok különböző hullámhosszon elnyelő pigment molekulák rendszerét tartalmazzák, amelyek arányának változtatásával is képesek alkalmazkodni a változó környezethez. Az *Acaryochloris marina* egy *d*-klorofill tartalmú cianobaktérium, amely fotoszintézisét távoli vörös fényben gazdag környezethez adaptálta, azonban elsősorban sokrétű kromatikus akklimációjának köszönhetően képes a látható fénytartomány széles spektrumát hasznosítani, és jelentősen eltérő fényintenzitásokhoz alkalmazkodni.

A cianobaktériumok körében elterjedt másik védekezési mechanizmus a PSII D1/D2 heterodimert kódoló *psbA* és *psbD* gének duplikátumai révén valósul meg. A fotofoszforiláció kezdeti katalitikus lépése, az erősen oxidatív vízbontás a PSII komplexben zajlik. A vízbontás során esetlegesen fellépő oxidatív stressz elkerülése érdekében a PSII köré komplex védőmechanizmus kiépítésére volt szükség, melynek egyik módja a központi heterodimer vízbontásban leginkább érintett D1 alegységének gyakori lecserélése. A fotoszintetikus védelmi- és akklimációs rendszerük részeként a cianobaktériumok az eukarióta szervezetektől eltérő módon gyakran hordoznak egy vagy több *psbA* génduplikátumot, melyek az intenzív D1 szintézishez biztosítanak nagyobb transzkript állományt. Egyes *psbA* duplikátumok szekvencia módosuláson mennek keresztül, és e homológ-variancia révén különböző elsődleges szerkezetű és valamelyest eltérő működésű D1 izoformák jöhettek létre. Az eltérő redox tulajdonságokkal rendelkező izoformák felváltva fejeződhetnek ki, és épülhetnek be a PSII komplexekbe az adott körülményektől függően, így optimalizálhatják a fotoszintetikus elektrontranszportot az eltérő környezeti feltételekhez történő alkalmazkodás során. Az eddig ismert cianobakteriális genomokban a *psbA* géncsaládok 2-5 tagúak, és 1-3 különböző izoformát kódolnak. Azonban az eddig ismert cianobaktériumokban a *psbD* génnek legfeljebb



egyetlen duplikátuma fordul elő genomként, és a két homológ azonos aminosav szekvenciájú D2 fehérjét kódol.

A D1/D2 központi heterodimer mellett található a citokróm b559 redox-aktív fehérje, amely két alegységből áll. Mindkét alegység rendelkezik egy-egy konzervált hisztidinnel, amelyek imidazol oldallánca hemcsoport kötéséért felelős. Minden eddig tanulmányozott, PSII-vel rendelkező szervezetben a citokróm b559 két különböző,  $\alpha$  és  $\beta$ , alegységet tartalmazó heterodimerből épül fel. Az  $\alpha$  és  $\beta$  alegységeket kódoló *psbE* és *psbF* gének termékei a *psbEFLJ* policisztronos mRNS-ben íródnak át. Ez alól egyetlen kivétel ismert, az eukarióta zöldalga, *Chlamydomonas reinhardtii*, ahol a *psbE* és *psbF* gének egymástól szeparáltan, egy *psbE*, és egy *psbFLJ* átíróadási egységben kódoltak.

Az *Acaryochloris marina* viszonylag nagyméretű genommal (8.36 Mb), jelentős génállománnyal (8462 gén), és nagyszámú plazmiddal (9 db) rendelkezik. Ezt a tulajdonságát nagymértékű alkalmazkodó képességével már korábban kapcsolatba hozták. A 2008-ban elérhetővé vált *Acaryochloris marina* teljes genom szekvenciájából három *psbA*, valamint sajátos *psbD*, és az  $\alpha$ -citokróm b559 PSII alegységet kódoló *psbE* duplikátumokra derült fény. Eddigi ismereteink szerint az *Acaryochloris* nemzetségbe tartozó cianobaktériumok lehetnek az egyedüli organizmusok, amelyek két D2 izoformát kódoló három *psbD* továbbá a kettő *psbE* homológgal rendelkeznek, és feltehetően e génduplikátumok is ezen adaptív fajok fotoszintetikus akklimációját szolgálják. Az *Acaryochloris marina* genomszekvenciájából fény derült továbbá a kétirányú hidrogenázt kódoló *hox* gének meglétére. E gének elrendeződése a *Synechocystis* PCC6803 fajban leírtakkal analóg, ugyanakkor *Acaryochloris marina* esetében a *hox* klaszter nem a kromoszómán, hanem plazmid DNS-en található.

A jelen dolgozatban *Acaryochloris marina* szélsőségesen alacsony fényintenzitáshoz, valamint távoli vörös fényhez történő alkalmazkodását vizsgáltuk, amelyet változó klorofill fluoreszcencia, oxigénfejlesztési ráta, valamint abszorpciós mérésekkel követtünk nyomon. Vizsgáltuk továbbá az alacsony és magas intenzitású-, ill. távoli vörös hullámhosszú fény, UV-B sugárzás, elektrontranszport gátlás és oxigénhiányos környezet *psbA*, *psbD*, *psbE*, és *psbF* gének kifejeződésére gyakorolt hatását, melyet a I. ábrán foglaltunk össze. A D1/D2/citokróm b559 PSII központi alegységeket, valamint a Hox hidrogenázt kódoló transzkriptek relatív szintjét Q-PCR módszerrel határoztuk meg.

Az *Acaryochloris marina* három *psbA* és *psbD* génjei közül 2-2 a kontrol körülmények között dominánsan jelenlevő D1<sub>m</sub>, illetve D2<sub>m</sub> (m=major) izoformát kódolja,

a harmadik transzkript pedig a *psbA* és *psbD* homológok esetében egyaránt egy eltérő elsődleges szerkezetű izoformát kódol. Az  $\alpha$ -citokróm b559 PSII alegységet kódoló *psbE* homológok közül a *psbE1* feltételezett terméke jelentősen eltér a *psbE2* által kódolt fehérje- és a konszenzus aminosav szekvenciától. A divergens fehérje kópiákat a PSII-E', D1' és D2' elnevezéssel illettük követve a D1 izoformákra felállított funkcionális nevezéktant (I. táblázat).

		NF	MF	UV-B	DBMIB	<del>Ø2</del>	AF	720nm	sötét	DCMU
D1 <sub>m</sub>	<i>psbA2</i>	●	●↑	●↑	●↓	●↑	●↓	●↑	●↓	●—
	<i>psbA3</i>	●	●↑	●↑	●↓	●—	●↓	●↑	●↓	●—
D1'	<i>psbA1</i>	•	•—	•↑	●↑	•↑	•—	•—	•—	•—
D2 <sub>m</sub>	<i>psbD1</i>	●	●—	●—	●↓	●—	●↓	●↑	●↓	●—
	<i>psbD2</i>	●	●↑	●↑	●—	●—	●↓	●↑	●↓	●↑
D2'	<i>psbD3</i>	•	•↓	•—	•—	•—	●↑	●↑	●↑	•↑
PSII-E	<i>psbE2</i>	●	●—	●—	●—	●—	●—	●↑	●—	●—
PSII-E'	<i>psbE1</i>	•	•—	•—	•—	•—	•—	•—	•—	•—
PSII-F	<i>psbF</i>	•	•—	•—	•—	•—	•—	•—	•—	•—

**I. ábra: A D1 és D2 izoformákat kódoló különböző *psbA*, és *psbD* homológok, valamint a citokróm b559 alegységeket kódoló gének aktivációja, és egymáshoz viszonyított kifejeződése a dolgozatban vizsgált körülmények között**

A foltok mérete az adott PSII alegységet kódoló homológ transzkriptek egymáshoz viszonyított százalékban kifejezett arányával analóg. (A *psbE1*, *psbE2* és *psbF* transzkripteket egy mRNS állománynak vettük, ennek megfelelően összegükhöz viszonyított arányukat prezentáljuk). A nyilak iránya az adott gén relatív transzkript szintjének növekedését vagy csökkenését jelöli. A vízszintes vonalak esetén nincs változás.

A citokróm b559  $\alpha$  alegységet kódoló *psbE1* és *psbE2* gének a genomban külön, a *psbE1F*, és a *psbE2LJ* klaszterben találhatóak. Minden, a jelen tanulmányban vizsgált körülmény során a *psbE2* gén termékének relatív szintje összevethető volt az abundáns

D1/D2 PSII heterodimert kódoló transzkriptek mennyiségével, amíg a *psbE1* ~2 nagyságrenddel alacsonyabb kifejeződést mutatott. A domináns kifejeződést mutató *psbE2* promótere által meghajtott génklaszter azonban nem tartalmazza a citokróm b559  $\beta$  alegységét kódoló *psbF* gént, hanem az a *psbE1* géntől „downstream” helyezkedik el, és valószínűleg a *psbE1* promóterének szabályozása alatt áll. Ebből kifolyólag a citokróm b559  $\alpha$  és  $\beta$  alegységeinek transzkript állománya között is megmutatkozik a jelentős, ~2 nagyságrendnyi különbség (I. ábra). Ez az eredmény nehezen egyeztethető össze az eddigi ismereteink alapján  $\alpha$  és  $\beta$  alegységet 1:1 arányban tartalmazó PSII szerkezettel, amely alapján a transzkriptek eloszlását is hasonlóan várnánk. Továbbá megfigyeltük, hogy távoli vörös fényben, amikor a sejtek megnövelik PSII komplexeik mennyiségét, a D2<sub>m</sub>, D1<sub>m</sub>, D2' valamint a PSII-E alegységeket kódoló transzkriptek mennyisége növekedett. A *psbA1* *psbE1* és *psbF* gének kifejeződése távoli vörös fényben azonban nem változott, valószínűsíthető tehát, hogy e transzkriptek jelentéktelen mennyiségben, vagy egyáltalán nem szolgálnak templátként a *de novo* PSII szintézis során. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az eddig ismert PSII  $\alpha/\beta$  citokróm b559 heterodimer helyett az *Acaryochloris marina* PSII komplexei  $\alpha/\alpha$  citokróm b559 homodimert tartalmaznak.

Az *Acaryochloris marina* sötétben erős respirációs oxidáz aktivitást mutat, melynek következtében ennél a fajnál a cianobaktériumok nagy részétől ellentétes módon sötétben a plasztokuinon molekulák (PQ) állományában az oxidált kinon molekulák redukált kinolokhoz viszonyított aránya megnövekszik. Távoli vörös és alacsony intenzitású látható fényben szintén PQ oxidációt figyelhetünk meg. Feltételezhetően azért, mert ilyen körülmények között a PQ állományt oxidáló hatások (egyes-típusú fotokémiai rendszer (PSI) és oxidázok) erőteljesebbek, mint a PSII-ből származó elektrontranszport. Szemben a PSII centrumokkal az PSI nem alkot szuperkomplexet a 645 nm-en elnyelő fikobiliproteinekkal. Ezért a 720 nm-es fény jobban hasznosítható a csak távoli vörösben elnyelő PSI centrumok számára. Ebből kifolyólag ezen a hullámhosszon a PQ→PSI a PSII→PQ elektrontranszportnál intenzívebb. A két reakció centrum között adódó egyenlőtlen gerjesztést a sejtek a PSII számuk növekedésével ellensúlyozzák ki. Eközben a sejtek fikobiliprotein tartalma fokozatosan lecsökken, tehát egyre több fikobiliprotein nélküli PSII-t tartalmaznak. Az alacsony intenzitású fényviszonyokhoz az *Acaryochloris marina* feltételezhetően Pcb antennáinak kibővítésével próbálja hatékonyabbá tenni fényelnyelését. Erre utal a *d*-klorofill *in vivo* abszorpciós csúcsban tapasztalt vörös eltolódás, amely nagy valószínűséggel a klorofill *d* fehérjekörnyezetének átrendeződéséből ered.



## Summary

The cyanobacterial hydrogenases are becoming of great importance in the aim of developing new techniques for gaining renewable and clean fuel. One of the biotechnological approaches would use the bidirectional hydrogenase (Hox) that can be directly or indirectly connected to the photosynthetic electron transport. The Hox enzyme, by using NAD(P)H derived from photophosphorylation, could convert solar energy into hydrogen that could be used for a wide range of industrial purposes. Providing the knowledgebase for this approach gives a great importance for the studying of the function and regulation of the Photosystem II (PSII) and the Hox; the two key enzymes involved in hydrogen evolution based on reducing power that originates from water splitting. Herein we studied the expression of the genes encoding the core of the PSII and the Hox hydrogenase in the marine cyanobacterium, *Acaryochloris marina*.

The regulation of the NiFe-type bidirectional Hox hydrogenase is well studied in the fresh water cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. The genes of the bidirectional hydrogenase in this model organism are encoded by the *hoxEFUYH* operon under the regulation of the promoter region upstream *hoxE*. The arrangement of the *hox* genes in *Acaryochloris marina* is analogous to that in *Synechocystis* PCC 6803, although the *hox* cluster is found on the chromosome in the case of *Synechocystis* PCC 6803, and encoded in plasmid DNA in the case of *Acaryochloris marina*.

The protein surroundings of the  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  cluster in the Photosystem II are highly prone to photodamage due to the strongly oxidative chemistry of the water splitting. The D1 subunit of Photosystem II is directly and indirectly involved in the water oxidation with one of its tyrosine residues and by the ligation of the  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  cluster, respectively. Therefore, the D1 subunit of the core heterodimer is primarily exposed to photodamage. All the oxygenic photosynthetic organisms developed a photoprotection mechanism that involves the regular and specific degradation and resynthesis of the D1 subunit without the further disassembly of the complex.

Cyanobacteria are among the most adaptive photosynthetic organisms on Earth. They can adapt to highly diverse ecological niches with different accessibilities of light, as well as variable temperatures, salt concentrations and pH. They developed several methods for protecting their photosynthetic apparatus. One of these mechanisms involves several homologues of *psbA* genes encoding the D1 subunit of the Photosystem II. The principal

advantage of these *psbA* gene duplications is to provide an extended transcript pool for the enhanced synthesis of the D1 protein. Some of these *psbA* gene duplications went through mutations, and their products have altered primary structure. Various isoforms of D1 with different redox properties can be found within one cyanobacterial cell, and by switching between the different isoforms under certain varying conditions cyanobacteria can optimize their photosynthesis during acclimation. Some of the strains also contain one *psbD* gene duplication which code for identical D2 proteins of the core heterodimer.

*Acaryochloris marina* is a highly adaptive cyanobacterium, which can live under largely different environmental conditions. Its main known habitat is at the underside of ascidians where only far red light penetrates. *Acaryochloris*-like cyanobacteria also thrive underneath crustose coralline algae in a widespread endolithic habitat where only far red light is available to drive photosynthesis. However, *Acaryochloris marina* can be cultured in laboratory environment under visible light, and was shown to perform various responses of chromatic photoacclimation when adapting to different qualities and quantities of light. Moreover, another species in the *Acaryochloris* genus is a free living form in the ocean. Therefore, *Acaryochloris marina* is able to acclimate to environments with both visible and far red light. *Acaryochloris marina* has a considerably large, 8.36 Mb genome containing 8462 genes of which 2129 are located on 9 plasmids. Its extended genome with numerous plasmids was previously proposed to be connected with its dynamic niche. Having three copies of both *psbA* and *psbD* encoding two different D1 and D2 isoforms, respectively is also likely to be part of its arsenal that has been developed during evolution in order to aid adaptation.

In the present study the acclimation of *Acaryochloris marina* was followed by fast chlorophyll fluorescence, oxygen evolution rate, absorbance and relative gene expression measurements carried out by Q-PCR method. Transcriptional responses of the genes encoding the Hox hydrogenase as well as the different homologues encoding the D1/D2/cytochrome b559 core of the Photosystem II were examined under various conditions. The main features of changes regarding the induction or suppression of the different homologues encoding the core Photosystem II subunits, as well as their contribution to the respective mRNA pools is summarized in Fig. I. These data reveal the large extent of plasticity of transcriptional regulation of the various homologues of PSII RC subunits in response to changing environmental conditions as discussed below.

		NF	MF	UV-B	DBMIB	<del>62</del>	AF	720nm	sötét	DCMU
D1 <sub>m</sub>	<i>psbA2</i>	●	●↑	●↑	●↓	●↑	●↓	●↑	●↓	●—
	<i>psbA3</i>	●	●↑	●↑	●↓	●—	●↓	●↑	●↓	●—
D1'	<i>psbA1</i>	•	•—	•↑	●↑	•↑	•—	•—	•—	•—
D2 <sub>m</sub>	<i>psbD1</i>	●	●—	●—	●↓	●—	●↓	●↑	●↓	●—
	<i>psbD2</i>	●	●↑	●↑	●—	●—	●↓	●↑	●↓	●↑
D2'	<i>psbD3</i>	•	•↓	•—	•—	•—	●↑	●↑	●↑	•↑
PSII-E	<i>psbE2</i>	●	●—	●—	●—	●—	●—	●↑	●—	●—
PSII-E'	<i>psbE1</i>	•	•—	•—	•—	•—	•—	•—	•—	•—
PSII-F	<i>psbF</i>	•	•—	•—	•—	•—	•—	•—	•—	•—

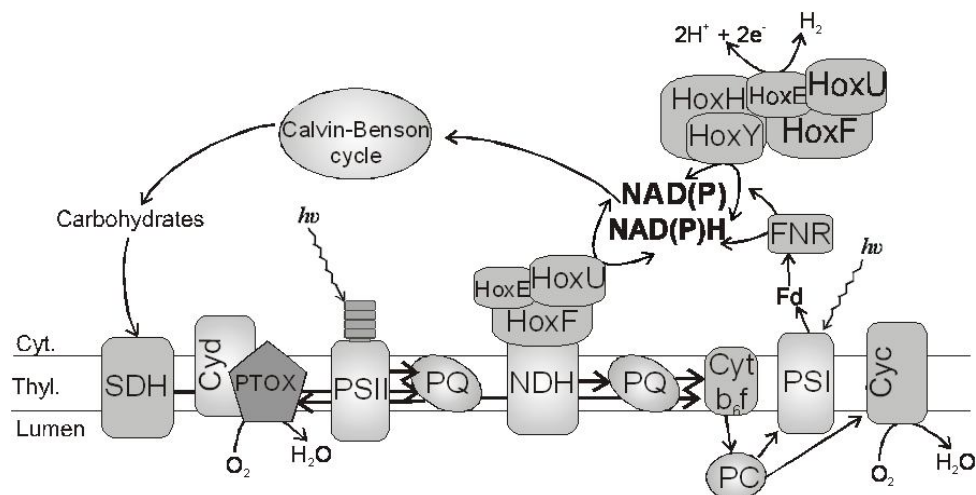
**Figure I. Relative transcript abundances of the *psbA*, *psbD*, *psbE* and *psbF* genes, and the direction of their changes under the various experimental conditions applied in the present study.** The size of the spots reflects the approximate percentage by which the particular transcript contributes to the mRNA pool of its homologues. The *psbE1* and *psbE2* together with *psbF* transcripts were taken as one mRNA pool of cytochrome b559 encoding genes. The arrows represent the up or down regulation of the particular gene. Horizontal bars represent no changes.

The significant difference in the amount of the *psbE* and *psbF* transcripts that encodes the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of cytochrome b559 indicates that in contrast to the already characterized Photosystem II complexes in nature in which the protein backbone of cytochrome b559 is made up by an  $\alpha$ - $\beta$  heterodimer the Photosystem II reaction center of *Acaryochloris marina* is likely to contain an  $\alpha$ - $\alpha$  homodimer of cytochrome b559 subunits.

*Acaryochloris marina* was found to be able to increase the number of its Photosystem II complexes when acclimating to far red light illumination, while decreasing its phycobiliprotein content. The adaptation to extreme low intensities of visible light results in a red shift in the *in vivo* absorption peak of chlorophyll *d*, suggesting that adjusting the light harvesting system to poor availability of accessible light involves the chlorophyll *d* containing Pcb inner antennas. Both, far red, and low intensity illumination caused the oxidation of the plastoquinone pool, indicating a strong oxidizing force on the pool, which was also observed during dark adaptation. Unlike most of the cyanobacteria during dark adaptation *Acaryochloris marina* showed intensive aerobic respiration, with a rate that was higher than the rate of oxygen evolution by its photosynthesis. Due to the strong respiratory oxidase activity the plastoquinone pool gradually gets oxidized during dark adaptation.

The genes encoding the bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* PCC 6803 were found to be regulated by oxygen and the photosynthetic electron transport. These are also the main factors affecting the enzyme activity. Interestingly, the *hox* genes of *Acaryochloris marina* that encode the oxygen sensitive hydrogenase enzyme showed the highest induction in the presence of oxygen during dark adaptation, when the activity of the aerobic respiration increased. The *hox* genes were also induced during acclimation to low intensities of light, as well as far red light illumination, which both results in plastoquinone oxidation. Based on these data, and also on the presence of genes encoding several oxidases acting on plastoquinone pool, we hypothesize that the physiological function of the Hox in *Acaryochloris marina* is connected to the electron transport in the thylakoid membrane as shown in Figure II.





**Figure II. The hypothesized model of electron transport in the thylakoid membrane of *Acaryochloris marina*.** The abbreviations used in the figure are as follows: Cyc: c-type cytochrome oxidase, Cyt: bd-type cytochrome oxidase, cyt<sub>b<sub>6</sub></sub>f: cytochrome b<sub>6</sub>f, Fd: Ferredoxin, FNR: Ferredoxin-NADP-reductase, PTOX: Plastoquinone terminal oxidase, PQ: plastoquinone pool, PC: plastocyanin, SDH: Succinate Dehydrogenase, NDH: NADH Dehydrogenase complex I.

According to the present study the remarkable ability of *Acaryochloris marina* to acclimate to different light conditions is also related to its unique photosynthetic gene arsenal including 3 *psbA*, 3 *psbD* genes, which encode 2 different isoforms of the D1 and D2 Photosystem II reaction center proteins, respectively. The significant induction of the *hox* genes during acclimation to low light intensities or to far red light illumination suggest that the possible function of the Hox enzyme of *Acaryochloris marina* is the fine-tuning of the electron transport during acclimation to PQ oxidizing conditions.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Vass Imrének, hogy lehetővé tette számomra, hogy a Molekuláris Stressz- és Fotobiológiai Csoportban dolgozhassak.

Köszönettel tartozom Dr. Vass Imrének, Dr. Kós Péter Balázsnak, Dr. Deák Zsuzsannának a kísérleti munkámban nyújtott messzemenő technikai segítségért, szakmai, gyakorlati és az élet számos más területére kiterjedő tanácsokért.

Köszönöm Fleit Gabriellának a munkám számos területén nyújtott odaadó segítségét. Köszönet a csoport minden dolgozójának, hogy segítették munkámat.

Köszönet illeti Dr. Min Chen-t, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az *Acaryochloris marina* törzset, és amiért nagyszerű együttműködő partnerként ötleteivel, tanácsaival folyamatosan segítette munkámat.

Köszönöm Annus Editnek a határtalan kedvességét, és hogy a Ph.D. ügyintézésem során mindig számíthattam a segítségére.